



MANUAL DE MÉTODOS PARA EL ANÁLISIS DE PARAMETROS OCEANOGRÁFICOS EN LA ESTACIÓN SERIE DE TIEMPO CARIACO



HANDBOOK OF METHODS FOR THE ANALYSIS OF OCEANOGRAPHIC PARAMETERS AT THE CARIACO TIME-SERIES STATION





**Dedicado al Hermano Ginés por su maravillosa labor por las ciencias marinas en
Venezuela**

ESTUDIO SERIE DE TIEMPO CARIACO

MANUAL DE MÉTODOS PARA EL ANÁLISIS DE PARAMETROS OCEANOGRÁFICOS EN LA ESTACIÓN SERIE DE TIEMPO CARIACO

EDITORES

**YRENE M. ASTOR
LAURA LORENZONI
MARY SCRANTON**

AUTORES

**YRENE M. ASTOR
KENT FANNING
LAURENCIA GUZMAN
XIAONA LI
LAURA LORENZONI
ROBERT MASSERINI
FRANK MULLER-KARGER
ERIC TAPPA
RAMÓN VARELA**

2011

TABLA DE CONTENIDO

Lista de Figuras	3
Lista de Tablas	4
INTRODUCCIÓN	5
Método 1. Captación de Muestras.	7
Método 2. Manejo y Procesamiento de Datos del CTD.	11
Método 3. Determinación de Salinidad.	21
Método 4. Determinación de. Sulfuro de Hidrógeno	23
Método 5. Determinación de Oxígeno Disuelto.	29
Método 6. Determinación de pH.	34
Método 7. Determinación de Alcalinidad Total	38
Método 8. Determinación de los Coeficientes de Absorción Espectral de las Partículas y del Fitoplancton.	43
Método 9. Determinación de Materia Orgánica Disuelta Coloreada.	48
Método 10. Determinación de Carbono Orgánico y Nitrógeno Total y Disuelto.	51
Método 11. Determinación de Carbono y Nitrógeno en Partículas.	56
Método 12. Determinación de Nutrientes Usando Analisis de Flujo Continuo (AFC).	60
Método 13. Determinación de Clorofila <i>a</i> y Feopigmentos.	79
Método 14. Determinación de Producción Primaria.	85

Lista de Figuras

Figura 4.1. Método de captación de la muestra para H ₂ S	28
Figura 12.1. Principales componentes de un sistema de AFC (Gordon <i>et al.</i> , 2000)	70
Figure 12.2. Esquema para la preparación del estandar de ácido silícico.	71
Figura 12.3. Diagrama de flujo para el método de fosfato (Gordon <i>et al.</i> , 2000).	72
Figura 12.4. Diagrama de flujo del sistema de nitrato (Gordon <i>et al.</i> , 2000).	73
Figura 12.5. Columna de Cd-Cu empacada para uso en un AA-II (Gordon <i>et al.</i> , 2000).	74
Figura 12.6. Diagrama de flujo para el método de nitrito (Gordon <i>et al.</i> , 2000).	75
Figura 12.7. Diagrama de flujo para el sistema de ácido silícico (Gordon <i>et al.</i> , 2000).	76
Figura 12.8. Diagrama de flujo para el sistema de amonio (Gordon <i>et al.</i> , 2000)	77
Figura 14.1. Diagrama del procedimiento a seguir durante el análisis de producción primaria. Los viales marcados con S contienen 200 µL de 2-feniletilamina.	93
Figura 14.2. Curva de la energía solar diaria en la estación CARIACO. La línea vertical indica el periodo de incubación realizado en CARIACO.	94

Lista de Tablas

Tabla 1.1. Variables medidas en los lances oceanográficos del proyecto CARIACO.	8
Tabla 1.2. Secuencia de los muestreos en la estación CARIACO.	9
Tabla 1.3. Secuencia de lances oceanográficos y orden de captación de las muestras.	10
Tabla 5.1. Densidad del agua destilada a una temperatura t °C.	33
Tabla 12.1. Volumen del estandar A (o B en caso del amonio y nitrito) para preparar soluciones estandar C. AMBN es agua de mar baja en nutrientes.	78

AGRADECIMIENTOS

Deseamos expresar nuestra gratitud al Dr. James Swift, Director del CLIVAR and Carbon Hydrographic Data Office (CCHDO) por el permiso para incluir las figuras de diagramas de flujo del autoanalizador publicadas en el manual “A Suggested Protocol for Continuous Flow Automated Analysis of Seawater Nutrients” (del WOCE Hydrographic Program y el Joint Global Ocean Fluxes Study, Gordon *et al.*, 2000). Agradecemos también a Euclides Rada quien colaboro al principio de la redacción de este manuscrito.

También deseamos expresar nuestra gratitud a los diversos organismos que a través de los años han dado el aporte financiero para que el proyecto CARIACO pueda continuar operando: El Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Tecnológicas (CONICIT, 96280221), el Fondo Nacional de Ciencia y Tecnología (FONACIT, 2000001702) ambos de Venezuela. La National Science Foundation (NSF Grants OCE- 0752139, OCE-9216626, OCE-9729284, OCE-9401537, OCE-9729697, OCE-9415790, OCE-9711318 y OCE 0963028 a FMK; OCE-9415790, OCE-9711318, OCE-9730278, OCE-0118491, OCE-0326175 y OCE-0752014 a MIS y GTT; OCE-0752037 y OCE-1039503 a RT) y la National Aeronautics and Space Administration (NASA): NAG5-6448 y NAS5-97128.

Dedicamos este manual al Dr. Pablo Mandazen (Hermano Ginés) por su confianza en nuestras actividades.

INTRODUCCION

Frank Muller-Karger

El enfoque del programa de serie de tiempo marina CARIACO (CARbon Retention In A Colored Ocean) es la recolección de un conjunto de observaciones oceanográficas en la estación CARIACO (10°30'N, 64°40'W), ubicada en la zona más profunda de la cuenca oriental de la Fosa de Cariaco, frente a la costa de Venezuela. El programa CARIACO se estableció en 1995 como infraestructura disponible a la comunidad científica produciendo datos de alta calidad en un tiempo razonable. Un objetivo clave de este esfuerzo es servir de plataforma científica a la comunidad internacional que estudia el carbono oceánico y la biogeoquímica así como también la que investiga el paleoclima, manteniendo un programa de observación a largo plazo del ecosistema de la Fosa de Cariaco.

CARIACO es una de las tres estaciones de series de tiempo oceanográficas biogeoquímicas establecidas con apoyo de la National Science Foundation (NSF) de los Estados Unidos y de gobiernos e instituciones locales. Las otras dos son las llamadas A Long-term Oligotrophic Habitat Assessment (ALOHA; 22°45'N, 158°00'W) y Bermuda Atlantic Time-series Study (BATS; 31°45'N, 64°10'W). ALOHA y BATS sirven como plataformas para el estudio de cambios en el Océano Pacífico y el Atlántico Norte, respectivamente, mientras que la serie de tiempo CARIACO está situada en un ambiente tropical en un margen continental. Esta región se caracteriza por tener una producción primaria anual que duplica aproximadamente la producción y el flujo vertical de material orgánico en partículas que se observa en las aguas más oligotróficas. El programa CARIACO provee la oportunidad de estudiar procesos biogeoquímicos y el ecosistema en la zona eufótica así como a profundidades mayores a lo largo de un gradiente óxico/anóxico.

Cruceros oceanográficos mensuales se han llevado a cabo en la estación CARIACO desde octubre del año 1995 para obtener un conjunto de observaciones claves en aguas óxicas y anóxicas. El objetivo es medir la variabilidad temporal y las tendencias a nivel estacional, interanual, e interdecadal. La serie de tiempo se basa en el objetivo científico de entender la relación entre la hidrografía, comunidad y composición planctónica, producción primaria, actividad microbiana, aportes terrígenos, flujos de sedimento y ciclos biogeoquímicos en la columna de agua, y cómo cambios en éstos procesos se preservan en los sedimentos.

La serie de tiempo oceanográfica CARIACO le debe su éxito a numerosos factores. De importancia primordial es el entendimiento de que una buena observación (un buen dato) es crítico para lograr buena ciencia. Los científicos, el personal técnico y los estudiantes involucrados en recoger observaciones dentro del marco del programa CARIACO están dedicados a monitorear continuamente la calidad de los datos que se obtienen, y a revisar métodos y técnicas para asegurar los más altos niveles de calidad para cada observación recogida.

Otro factor esencial son los estrechos lazos establecidos entre los científicos que participan. Las tres universidades de Estados Unidos (University of South Florida, University of South Carolina, y Stony Brook University) y cuatro instituciones venezolanas (Fundación La Salle, Univ. Simón Bolívar, Univ. de Oriente, y el Centro de Procesamiento de Imágenes) involucradas en recoger las observaciones medulares del programa CARIACO tienen vínculos administrativos estrechos que

permiten comunicaciones frecuentes, rápidas y efectivas, transferencia de muestras y datos, asistencia técnica, y de fondos cuando se requiera.

Otro factor importante en el éxito es facilitar el libre acceso a las bases de datos tan pronto como la calidad del dato sea aceptable y se encuentre disponible. Datos básicos hidrográficos, biológicos y químicos obtenidos bajo el proyecto CARIACO se envían regularmente al *National Oceanographic Data Center* (NODC-NOAA) y a la base de datos *SeaBASS* de la NASA. También colaboramos y apoyamos plenamente al *Ocean Carbon and Biogeochemistry Data Management Office* (OCB DMO <http://ocb.who.edu/cariaco.html>; PI: D. Glover/WHOI), patrocinado por NSF. Todos los datos están disponibles al público a través de los portales de Internet <http://cariaco.ws> (Universidad Simón Bolívar, Venezuela) y <http://imars.usf.edu/cariaco/index.html>.

El apoyo de instituciones y autoridades locales también es clave para establecer y mantener un programa de series de tiempo. El proyecto CARIACO se beneficia de importantes aportes críticos en logística, infraestructura, interés, y apoyo financiero en Venezuela. La Fundación la Salle de Ciencias Naturales (FLASA) ha servido como base principal para todas las operaciones de campo y es el centro de enlace interinstitucional del proyecto en Venezuela. Administradores de FLASA y científicos han apoyado y participado en todos los aspectos del proyecto.

El programa CARIACO también es conocido y respetado por su liderazgo científico en América Central y Suramérica. Ha servido de modelo para otros programas nacionales de observación del mar en la región. En septiembre del 2006 el programa CARIACO fue reconocido en la sede de la Armada Nacional de Venezuela por la *Intergovernmental Oceanographic Commission* (IOC-UNESCO/IOCARIBE) por su excelencia en investigación y sus contribuciones al desarrollo de las ciencias marinas en la región.

Este manual fue escrito por científicos y personal técnico involucrados en CARIACO para documentar los métodos utilizados para recoger el conjunto de observaciones que constituye el programa de serie de tiempo. El manual explica los métodos tanto en inglés como en español para hacerlos acequibles a científicos y personal técnico interesado en los datos de CARIACO y en su operación, y a aquéllos quienes esten interesados en establecer programas de observación similares. El manual es uno de los logros del esfuerzo educacional que se lleva a cabo a través del proyecto. El esfuerzo de desarrollar el manual está inspirado en el manual de métodos que generó el programa US JGOFS BATS (UNESCO, 1994), y en general los métodos actualmente usados en CARIACO desde 1995, incluyendo modificaciones a éstos hechas desde entonces.

Referencias

UNESCO. (1994). Protocols for the Joint Global Ocean Flux Study (JGOFS) Core Measurements. IOC Manuals and Guides No. 29. UNESCO. Paris. P. 128-140.

Método 1. Captación de Muestras

Yrene M. Astor

Introducción

La frecuencia de muestreo en la estación de la serie de tiempo CARIACO es mensual y cada crucero oceanográfico tiene una duración de 24 horas. Las muestras de agua se recolectan en tres lances oceanográficos usando una roseta de 12 botellas Niskin con capacidad de 8 L, la cual se encuentra equipada con un CTD. Por otra parte, se efectúan mediciones radiométricas, arrastres de zooplancton y mediciones de corrientes con un perfilador acústico de corrientes doppler (ADCP). Los parámetros que se miden en cada crucero se especifican en la Tabla 1.1, y la Tabla 1.2 indica la secuencia de los diferentes tipos de lances.

El jefe científico coordina la logística de cada crucero oceanográfico, controla el muestreo y es responsable por la correcta realización de la secuencia y los protocolos de captación. Previo a la toma de muestras, el coordinador informa a los participantes del crucero de las tareas que van a realizar y repasa con el personal los métodos de captación y preservación adecuados para cada parámetro. Instrucciones que indiquen el protocolo de muestreo, método de preservación según el parámetro y las precauciones a seguir se colocan en zonas visibles alrededor de la roseta y en los laboratorios del barco para posibles consultas. Protocolos específicos al crucero que indiquen el orden de los lances oceanográficos, parámetros y responsables de la captación de muestras son también colocados en las zonas de trabajo.

Lances Oceanográficos

La medición y captación de las variables básicas de la serie de tiempo requiere de cuatro lances oceanográficos: calibración, producción primaria, intermedio-profundo, y poco profundo. Cada lance se realiza con una roseta (marca SeaBird, modelo SBE 32) equipada con un CTD (marca SeaBird, modelo SBE 25). Un resumen de la secuencia de los lances oceanográficos, profundidades a las cuales las botellas son cerradas, así como el orden de captación de las muestras se especifica en la Tabla 1.3. La profundidad del máximo de clorofila se determina a través del perfil del fluorómetro durante el lance de bajada. La profundidad de la interfase oxica-anóxica se determina con el perfil de bajada del sensor de oxígeno (el oxígeno desaparece) y el perfil de atenuación de la luz (un pico se presenta al incrementarse el número de bacterias en la interfase). Una vez que el sistema CTD-roseta sube a bordo se lava con agua dulce el CTD y los disparadores de las botellas y se procede inmediatamente a recolectar las diferentes muestras.

Tabla 1.1. Variables medidas en los lances oceanográficos del proyecto CARIACO.

PARÁMETRO	UNIDADES	REFERENCIAS
Temperatura	°C	SeaBird SBE 3F (6800 m)
Salinidad		SeaBird SBE 4C (6800 m)
Presión	db	SeaBird SBE 29 (2000 m)
Fluorescencia	mgCl <i>a</i> m ⁻³	WETlabs ECO-FLRTD
Oxígeno disuelto	ml L ⁻¹	SeaBird SBE 43
Coefficiente de atenuación de la luz	m ⁻¹	WETLabs C-star
Salinidad discreta		Guildline Portasal [®]
Oxígeno disuelto discreto	μM	Aminot y Chaussepied (1993)
pH		Clayton y Byrne (1993)
Sulfuro de hidrógeno	μM	Modificado de Cline (1969)
Alcalinidad total	μmol kg ⁻¹	Breland y Byrne (1993)
Nutrientes	μM	Gordon <i>et al.</i> (2000)
Carbono y nitrógeno orgánico en partículas	μg L ⁻¹	Sharp (1974)
Clorofila <i>a</i>	mgCl <i>a</i> m ⁻³	Holm-Hansen <i>et al.</i> (1965)
Fitoplancton	Células mL ⁻¹	Taxonomía, densidad Varias referencias
Producción primaria	mgC m ⁻³ h ⁻¹	JGOFS (1994)
Materia orgánica disuelta coloreada	m ⁻¹	Bricaud <i>et al.</i> (1981)
Absorción de partículas	m ⁻¹	Kishino <i>et al.</i> (1985)
Carbono orgánico total y disuelto/nitrógeno total y disuelto	μM	Dickson <i>et al.</i> (2007)

Tabla 1.2. Secuencia de los muestreos en la estación CARIACO

Tipo de muestreo	Hora	Profundidad (m)
Lance de calibración	4:00	200
Lance de producción primaria	4:30	100
Despliegue <i>in situ</i> de boya de producción	~ 7:00	
Lance intermedio-profundo	7:00	1310
Arrastre de zooplancton	9:00	200
Recuperación de la boya de producción	4 horas después de su despliegue	
Mediciones radiométricas	11:30	100
Lance con LADCP	12:30	400
Lance poco profundo	13:00	160

Tabla 1.3. Secuencia de lances oceanográficos y orden de captación de las muestras.

PROFUNDIDAD (m)	1	7	15	25	mcl	35	55	75	100	130	160	200	250	IN	300	350	400	500	750	1310
4:15 <i>Calibración</i>	Perfil continuo sin recolección de muestras																			
4:30 <i>Productividad Primaria</i>																				
Producción Primaria	x	x	x	x	x	x	x	x	x											
Absorción de partículas	x	x	x	x	x															
Taxonomía fitoplancton	x	x	x	x	x	x	x	x	x											
Clorofila y feopigmentos	xx	xx	xx	xx	xx	xx	xx	xx	xx											
HPLC	x	x	x	x	x	x	x	x	x											
7:00 <i>Intermedio-profundo</i>																				
Oxígeno disuelto												xx	xx	xx	xx	xx	xx			
pH												xx	x	xx	x	x	x	x	x	xx
Carbono orgánico total												x		x					x	x
Carbono orgánico disuelto												x		x						
Carbono y nitrógeno orgánico en partículas												x	x	x	x	x	x	x	x	x
Bacterias												x	x	x	x	x	x	x	x	x
Salinidad												x	x	xx	x	x	x	x	x	xx
Alcalinidad total												x	x	x	x	x	x	x	x	x
Nutrientes												x	x	x	x	x	x	x	x	x
13:30 <i>Poco Profundo</i>																				
Oxígeno disuelto	xx	xx	xx	xx		xx	xx	xx	xx	xx	xx									
pH	xx	x	x	x		xx	x	x	x	xx	x									
Materia orgánica disuelta coloreada	x	x	x	x																
Carbono orgánico total	x					x		x		x										
Carbono orgánico disuelto	x					x		x		x										
Carbono y nitrógeno orgánico en partículas	x	x	x	x		x	x	x	x	x	x									
Bacterias		x		x		x	x	x	x	x	x									
Salinidad	x	x	x	x		x	x	x	x	x	xx									
Alcalinidad total	x	x	x	x		x	x	x	x	x	x									
Nutrientes	x	x	x	x		x	x	x	x	x	x									
mcl = máximo de clorofila <i>a</i>																				
x = número de replicas que tiene cada profundidad																				
IN = interfase, límite entre la zona óxica y anóxica																				

Método 2. Manejo y Procesamiento de Datos del CTD

Yrene M. Astor y Ramón Varela

Introducción

A continuación se describen la operación del equipo CTD-roseta y el manejo y procesamiento de datos que se obtienen con el CTD para obtener perfiles continuos de parámetros básicos como temperatura, conductividad y presión, y de parámetros adicionales como fluorescencia, oxígeno disuelto, y coeficiente de atenuación de la luz. Este equipo realiza lances oceanográficos en tiempo real, lo que significa que los valores se leen y se graban simultáneamente a medida que se realiza el lance. Los sensores que conforman el equipo convierten el nivel de las variables ambientales del agua en medidas de voltaje ó frecuencia. A partir de estas variables se pueden derivar salinidad, profundidad, densidad, etc. Este capítulo describe el tipo de equipo que se emplea, su operación y el método que se sigue para el procesamiento de datos basándose en las recomendaciones de SeaBird Electronics (2008).

Equipo

Tres equipos conforman el **sistema** de SeaBird Electronics, Inc., que se utiliza para medir parámetros oceanográficos y captar muestras de agua. El **sistema** está compuesto por un equipo de medición CTD (modelo SEALOGGER SBE 25), un carrusel ó roseta (modelo SBE 32) y una unidad a bordo (modelo SBE 33). El CTD realiza registros a una velocidad de muestreo de 8 Hz y posee canales para siete sensores auxiliares. El carrusel es un instrumento electro-mecánico que activa el cierre de las botellas y la captación de muestras, y se encuentra equipado con 12 botellas Niskin. La unidad a bordo suministra energía, controla el carrusel, y permite ver los datos en tiempo real.

Sensores

El CTD incluye los siguientes sensores:

Presión. SeaBird Electronics, modelo SBE 29; rango de profundidad: 2000 m; exactitud: 0,1% de la escala total.

Temperatura. SeaBird Electronics, modelo SBE 3F; rango: -5 a 35 °C; exactitud: 0,002 °C; resolución: 0,0003 °C; tiempo de respuesta: 0,07 s; estabilidad: 0,002 °C año⁻¹; rango de profundidad: 2000 m.

Conductividad. SeaBird Electronics, modelo SBE 4; rango: 0 a 7 S m⁻¹; exactitud: 0,0003 S m⁻¹; resolución: 0,00004 S m⁻¹; tiempo de respuesta: 0,06 s con bomba; estabilidad: 0,0003 S m⁻¹ mes⁻¹; rango de profundidad: 2000 m.

Oxígeno disuelto. SeaBird Electronics, modelo SBE 43; rango: 120% del nivel de saturación en la superficie; exactitud: 2% de saturación; estabilidad: 2% en las primeras 1000 horas con la membrana limpia; rango de profundidad: 2000 m.

Transmisión de luz. WETlab, modelo C-Star; longitud del paso de luz: 25 cm; tiempo de respuesta: 0,167 s; sensibilidad: 1,25 mV; longitud de onda 660 nm; ancho de banda: ~ 20 nm; rango de profundidad: 6000 m.

Fluorescencia. WETlab, modelo ECO-FLRTD; rango: 0,01 – 125 $\mu\text{g L}^{-1}$; sensibilidad: 0,01 $\mu\text{g L}^{-1}$; linealidad: 99% R^2 ; Excitación/Emisión: 470/695 nm; rango de profundidad: 6000 m.

La mayoría de estos sensores requieren de un flujo constante de agua para poder realizar las mediciones. Una **bomba** (SeaBird Electronics, modelo 5T, 2000 rpm) controla dicho flujo. Todos los sensores están colocados en una jaula acoplada por debajo de la estructura del carrusel de botellas. Cada sensor se conecta y coloca dentro de la jaula del CTD con una configuración específica para obtener mediciones precisas de las masas de agua que se analizan. SeaBird Electronics provee diagramas de configuración para diferentes aplicaciones (<http://www.seabird.com/>). Los sensores de presión, temperatura, conductividad y oxígeno disuelto se envían al fabricante una vez al año para calibración y mantenimiento.

Operación del CTD

Una vez que los equipos se encuentran a bordo del barco y antes de zarpar se debe probar el funcionamiento del **sistema** CTD - carrusel verificando la comunicación con el CTD, el registro de los datos y el accionamiento de las botellas. Al llegar a la estación, preparar el CTD para el descenso. Establecer comunicación con el instrumento utilizando el programa *Seaterm* y preparar la computadora para la presentación (mostrar y graficar los datos en tiempo real) y almacenamiento de los datos usando *Seasave*. Todos estos programas vienen en el paquete de programas *Seasoft* (<http://www.seabird.com/>). Encender el CTD justo antes de comenzar el descenso. Bajar el equipo hasta una profundidad de 7 m y mantenerlo a ese nivel por 5 minutos para que los sensores alcancen equilibrio. Este periodo de estabilización es necesario para permitir que el sistema se ajuste a la temperatura superficial del agua, la celda de conductividad se humedezca con agua de mar, la bomba encienda y se pueda confirmar la operación correcta del instrumento y los sensores (SeaBird Electronics, 2008). Una vez finalizado el periodo de estabilización, traer el equipo a la superficie sin que salga fuera del agua y comenzar el lance. Antes de comenzar el lance, parar la adquisición de datos y reiniciar, guardando el archivo con el mismo nombre con el fin de eliminar los datos grabados durante el periodo de estabilización. Estos datos son erráticos e inexactos y normalmente se eliminan durante el procesamiento.

Bajar el **sistema** CTD - carrusel a una velocidad de 0,75 - 1 m s^{-1} hasta la profundidad deseada. Verificar en tiempo real la operación de los sensores a través del programa *Seasave*. Durante el lance de bajada, identificar las profundidades de interés para la captación del agua. A parte de las profundidades pre-establecidas para CARIACO (**Metodo** 1), otras de interés son la profundidad del máximo de clorofila, de la interfase oxica-anóxica, etc. Las muestras se captan mientras el sistema regresa a la superficie. El sistema se mantiene por 2 minutos en cada profundidad antes de cerrar cada botella de manera de garantizar que la misma contenga el agua correspondiente a esa parcela de agua y los sensores se estabilicen. La turbulencia que se crea al subir el equipo puede impactar en el tipo de agua captada por lo que es importante esperar este tiempo prudencial antes de cerrar las botellas. El CTD registra las condiciones del agua para el momento del cierre de la botella y almacena la información en un archivo con la extensión .BL.

Los datos de cada lance se graban directamente en el computador del barco en tiempo real. Para cada lance, anotar en una planilla el nombre del archivo, hora, la posición GPS del barco, los

problemas que se presenten mientras se efectúa el lance y cualquier información relevante sobre el clima o condiciones del agua.

Al finalizar cada lance, el programa *Seasave* produce tres archivos con las siguientes extensiones:

- **.HEX.** Representación de la información del perfil como datos binarios en formato hexadecimal junto con un encabezado.
- **.CON.** Contiene la configuración del instrumento y los coeficientes de calibración usados por el programa.
- **.BL.** Almacena información sobre las condiciones del agua cuando cierra cada botella.

Mantenimiento del Equipo

Antes del crucero

1. Verificar las baterías del CTD antes de cada crucero.
2. La celda de conductividad es muy sensible al material que se deposita en los electrodos y la celda. Los electrodos son proclives a ensuciarse y el crecimiento bacteriano puede ser otra fuente de impurezas, lo que ocasiona un cambio en las dimensiones de la celda. Por lo tanto, lavar la celda con un detergente no-iónico (Tritón-X) antes de cada crucero.

Durante el crucero

1. Después de cada lance y cuando el sistema se encuentre a bordo, apagar y lavar el equipo para eliminar el agua salada de los instrumentos electrónicos, en especial atender la limpieza del sensor de conductividad, los disparadores de las botellas y las ventanas del medidor de transmisión de luz y fluorescencia. Al finalizar el crucero, lavar con agua y jabón.

Después del crucero

1. Lubricar las conexiones del instrumento con una capa ligera de grasa de silicona, la cual actúa como lubricante y sellador. Evitar lubricantes que rompan la adhesión entre tornillos y tuercas.
2. Verificar ocasionalmente los ánodos de sacrificio hechos de cinc.
3. Revisar periódicamente la manguera que conecta la bomba de agua con los sensores. Esta debe permanecer libre de desechos, basura y sucio para asegurar un buen flujo de agua.
4. Con el tiempo, los resortes y las juntas de goma en las botellas se debilitan permitiendo el intercambio entre la muestra que se captura y el agua circundante. Revisar estas partes regularmente y reparar cualquier fuga ó reemplazar material dañado.

Procesamiento de Datos

El procesamiento de datos de cada crucero consiste en convertir los datos crudos en unidades científicas a partir de las cuales se calculan las variables de interés, y reducir el tamaño de las

matrices de datos a una escala más manejable. Para el procesamiento de los datos se utiliza el paquete de programas *SBEDataProcessing-Win32* (SeaBird Electronics, Inc.). A continuación se enumeran los pasos a seguir para realizar el procesamiento de datos del CTD modelo SEALOGGER SBE 25.

Etapa 1 del procesamiento

1. ***Primer paso.*** Transformar los datos crudos del CTD (.HEX) en unidades científicas empleando el módulo *Data Conversión*. Esto genera un archivo con extensión .CNV que contiene los datos transformados. Graficar los datos con el módulo *Seaplot* y revisar la presencia de valores que difieren de la media por un número mayor a un valor específico de desviaciones estándar. Eliminar estos valores anómalos corriendo el módulo *Wildedit* tantas veces como sea necesario. Paralelamente, el módulo *Data Conversion* crea un archivo con extensión .ROS a partir del archivo .BL, el cual contiene información sobre las condiciones del agua al momento del cierre de las botellas.
2. ***Determinación de coeficientes de avance en segundos con respecto a la presión.*** Los sensores del CTD no se encuentran alineados físicamente en el sistema; asimismo, la velocidad de bombeo, montaje de las mangueras, tiempo de traslado del agua a través de las mismas, y balanceo del barco generan registros que no corresponden a la misma parcela de agua (SeaBird Electronics, 2008). Para corregir esto se utiliza el módulo *Align CTD*, el cual alinea los datos con respecto a la presión y asegura que los mismos caractericen la misma parcela de agua. Este módulo emplea coeficientes de alineación distintos para cada variable los cuales se establecen antes de comenzar la ***etapa 2 del procesamiento*** de datos. Por ejemplo, el avance de la señal con respecto a la presión para el sensor de oxígeno varía entre 3 y 7 segundos. Para escoger el valor de tiempo más adecuado, correr el módulo *Align CTD* a los datos transformados (.CNV) del lance de calibración con cada uno de los posibles avances creando un archivo diferente para cada uno. Graficar el dato de oxígeno para cada prueba con el módulo *Seaplot* y escoger el valor en segundos que minimice la diferencia entre el perfil de bajada y el de subida. El valor escogido se aplica a todos los archivos obtenidos durante ese crucero al correr el módulo *Align CTD* en la ***etapa 2 del procesamiento***. Este procedimiento se aplica también a los datos del medidor de fluorescencia y transmisión de luz.

Etapa 2 del procesamiento

1. Una vez establecidos los valores de alineación correctos, correr el módulo *Filter* a los datos transformados (.CNV). Este subprograma ‘suaviza’ los datos que presentan frecuencia muy alta. SeaBird suministra las constantes de tiempo para cada variable según sea el modelo del equipo. Para el SBE 25, SeaBird recomienda filtrar la presión con una constante de tiempo de 0,5 s y la conductividad con 0,03 s.
2. Correr el módulo *Align CTD*. Para el SBE 25 con una bomba estándar de 2000 rpm, SeaBird recomienda un avance típico de la conductividad relativo a la temperatura de + 0,1 s. Los valores adecuados para el sensor de oxígeno disuelto, fluorescencia y transmisión de luz se establecen en el apartado 2 de la ***Etapa 1 del procesamiento***. No es necesario alinear la temperatura cuando se emplea el CTD SBE 25.

3. En áreas con gradientes de temperatura muy marcados es necesario remover los efectos que la masa termal de la celda de conductividad tiene sobre la conductividad medida, de manera de minimizar la diferencia entre el perfil de bajada y de subida. Por tanto, utilizar el módulo *Cell Thermal Mass*. Los valores típicos recomendados por SeaBird para los coeficientes alfa y 1/beta para el SBE 25 son 0,04 y 8, respectivamente.
4. Correr el módulo *Loop Edit* para eliminar los datos que registra el CTD cuando desciende/asciende por debajo de la velocidad mínima ($0,25 \text{ m s}^{-1}$) ó cuando el sensor de presión muestra un movimiento inverso al ascenso/descenso del lance debido al balanceo del barco.
5. Calcular el oxígeno disuelto en ml L^{-1} y $\mu\text{mol kg}^{-1}$ con el módulo *Derive*.
6. Promediar los datos con el módulo *Bin Average* en funcion de la presión, profundidad, tiempo, ó número de registros especificando el rango deseado como intervalo.
7. Calcular parámetros como salinidad, sigma-t, densidad y temperatura potencial, saturación de oxígeno, etc., con el módulo *Derive*.
8. Calcular la frecuencia de flotabilidad (frecuencia Brunt-Väisälä, N) y la estabilidad (E) con el módulo *Buoyancy*.
9. Dividir el archivo procesado en lance de bajada y de subida usando el módulo *Split*.
10. Correr el módulo *Bottle Summary*, el cual lee los archivos .ROS creados por *Data Conversión* y escribe un resumen de los datos en un archivo .BTL donde especifica las condiciones del agua al momento de cerrar las botellas. El archivo .BTL incluye la posición y número de la botella, fecha/hora, variables derivadas seleccionadas, variables promediadas seleccionadas.

Etapa 3 del procesamiento

Para las siguientes correcciones se siguen las instrucciones suministradas por SeaBird Electronics (2008).

1. ***Corrección de salinidad con muestras discretas.*** Durante el lance de subida se captan una serie de muestras discretas de salinidad con las cuales se calibra la salinidad derivada a partir de las lecturas del sensor de conductividad del CTD. A continuación, los pasos a seguir:
 - a. Examinar los datos procesados en la ***Etapa 2 del procesamiento*** y escoger una sección del perfil donde los valores de salinidad discreta se mantengan constantes.
 - b. Dentro de esta sección, seleccionar dos profundidades. Del archivo .BTL extraer la presión, temperatura, conductividad, y salinidad de estas dos profundidades y colocar estos datos en una hoja de calculo. Incluir en una columna aparte la salinidad de las muestras discretas correspondientes a estas dos profundidades.
 - c. Calcular la conductividad de la muestra discreta a la presión y temperatura de cada una de las dos profundidades con el módulo *SeacalcW*.
 - d. Calcular la pendiente entre las dos profundidades con la siguiente ecuación:

$$m = \frac{(A * B) + (C * D)}{(A * A) + (C * C)} \quad (1)$$

donde

A = conductividad del CTD a profundidad X.

B = conductividad de la muestra discreta a profundidad X.

C = conductividad del CTD a profundidad Y.

D = conductividad de la muestra discreta a profundidad Y.

- e. Colocar el valor **m** en el apartado de pendiente de los coeficientes de conductividad del archivo de calibración (.CON) del crucero y grabar el archivo con un nombre diferente. Repetir las **Etapas 1 (Primer paso) y 2** utilizando el nuevo archivo de calibración.
 - f. Verificar la validez de la corrección, graficando los datos de salinidad de cada lance de bajada, antes y después de la corrección, junto con las salinidades de las muestras discretas y comparar las salinidades. Si la diferencia entre los datos corregidos y la salinidad discreta disminuye con respecto a la diferencia entre los datos no corregidos y la muestra discreta, la corrección es válida.
2. **Corrección de oxígeno disuelto con muestras discretas.** Al igual que con la salinidad, una serie de muestras discretas de oxígeno disuelto se captan en la capa oxigenada durante el lance de subida y se usan para calibrar el dato calculado a partir de los registros de voltaje del sensor de oxígeno. A continuación, los pasos a seguir:

- a. De los archivos .BTL, extraer presión, profundidad, temperatura, voltaje del SBE 43, y nivel de saturación de oxígeno en ml L⁻¹ de las profundidades a las cuales se captaron las muestras discretas, y colocar estos datos en una hoja de cálculo. Incluir en una columna aparte los valores de oxígeno disuelto de las muestras discretas obtenidos con la titulación Winkler.
- b. Calcular **TcorT** con la siguiente formula:

$$\mathbf{TcorT} = Tcor * T \quad (2)$$

donde

Tcor = valor del coeficiente Tcor del archivo de calibración.

T = temperatura (°C) del agua para cada profundidad.

- c. Elevar el valor calculado de **TcorT** a la exponencial (**e^{TcorT}**).
- d. Calcular **PcorP** con la siguiente formula:

$$\mathbf{PcorP} = Pcor * P \quad (3)$$

donde

Pcor = valor del coeficiente Pcor del archivo de calibración.

P = presión (db).

- e. Elevar el valor calculado de **PcorP** a la exponencial (**e^{PcorP}**).
- f. Calcular Phi con la siguiente formula:

$$\mathbf{Phi} = e^{TcorT} * \mathbf{OxiSat} (T,S) * e^{PcorP} \quad (4)$$

donde

OxiSat (T,S) = nivel de saturación (en ml L⁻¹) a la temperatura y salinidad a la cual se captó la muestra.

- g. Graficar O₂Winkler/Phi contra el voltaje del sensor SBE 43.
 - h. Calcular la regresión lineal de los datos.
 - i. El coeficiente de calibración **Soc** del sensor de oxígeno es igual a la pendiente de la gráfica, y el coeficiente **Voffset** es igual a la constante de la regresión lineal dividida por la pendiente de la curva.
 - j. Introducir estos dos nuevos coeficientes en un nuevo archivo de calibración (.CON) para el crucero y repetir las **Etapas 1 (Primer paso) y 2** utilizando este nuevo archivo.
 - k. Verificar la validez de la corrección, analizando las diferencias entre el valor de oxígeno disuelto del CTD sin corregir, el valor de oxígeno disuelto del CTD corregido y los valores discretos obtenidos con la titulación de Winkler.
 - l. Graficar estas diferencias contra valores discretos. Examinar si la corrección disminuye la diferencia entre los datos del CTD y los discretos.
 - m. Graficar los datos de oxígeno del CTD sin corregir, junto con el corregido y las muestras discretas, examinar si los datos corregidos coinciden con los discretos.
3. **Corrección de los datos del sensor de transmisión de luz.** Este sensor mide tanto la transmisión (%T) como el coeficiente de atenuación de la luz (c). La calibración del equipo se debe efectuar fuera del agua poco antes del crucero, preferiblemente en un laboratorio bajo condiciones estables. Una vez culminada la calibración, calcular los nuevos coeficientes e introducirlos en el archivo de calibración (.CON). Esto permite obtener en tiempo real el valor ajustado para este equipo sin requerir una corrección posterior.

Para la calibración se siguen las instrucciones suministradas por SeaBird en su hoja "Application Note N° 7", marzo 2004. Los valores son:

$$\text{Transmisión de luz (\%)} = (M * \text{Voltaje salida}) + B \quad (5)$$

$$\text{Coeficiente de atenuación (c)} = (1/z) * \ln(T) \quad (6)$$

donde

M, B = coeficientes de calibración.

z = longitud que recorre el haz de luz en metros (0,25 m Wet Labs modelo C-Star).

T = transmisión de la luz (en decimales) ó la transmisión en porcentaje dividida por 100.

- a. **Cálculo de M y B.** Conectar el CTD a una computadora y con el programa *Seaterm* escoger la opción de configuración SBE 25. Sin necesidad de encender el CTD, activar los comandos **>ds** para despertar el equipo y **>vr** para encender los sensores. En la pantalla se genera una lista de los voltajes de cada sensor separados por columnas. Bloquear el paso de luz con un trozo de fieltro negro para saber cual columna corresponde al sensor de transmisión de luz. Los valores de voltaje que tiendan hacia el cero son los que pertenecen a este sensor. Limpiar las ventanas del sensor de transmisión de luz para eliminar cualquier mancha. Frotar la ventana con un papel para

lente ligeramente humedecido en agua destilada, libre de cualquier impureza o polvo, y secar con otro papel para lente. No se debe frotar con fuerza sobre las ventanas. Repetir esta operación unas tres veces o hasta que el valor del voltaje alcance el valor máximo. Anotar este voltaje como “A1”. Proceder a bloquear el rayo de luz tapando con un fieltro negro la ventana del lado del sensor. Anotar el voltaje medido como “Y1”.

Los cálculos para determinar M y B según las indicaciones de SeaBird son:

$$M = \left(\frac{(T_w)}{(W0 - Y0)} \right) * \left(\frac{(A0 - Y0)}{(A1 - Y1)} \right) \quad (7)$$

$$B = -M * Y1 \quad (8)$$

donde

A0 = voltaje de salida en aire suministrado en el certificado de calibración.

Y0 = voltaje de salida en oscuridad ó cero (trayectoria bloqueada) suministrado en el certificado de calibración.

W0 = voltaje de salida en agua pura suministrado en el certificado de calibración.

T_w = porcentaje de transmisión en agua pura, relativa al agua (100%, el valor calculado suministra el coeficiente de atenuación, c_p, debido solo a las partículas) o al aire (90,2%, empleando este porcentaje el coeficiente de atenuación calculado es c que equivale a la atenuación debida al agua y a las partículas).

A1 = voltaje medido al ajustar la calibración en el aire.

Y1 = voltaje medido al ajustar la calibración bloqueando el paso de luz.

Colocar los coeficientes M y B en el archivo de calibración (.CON) del CTD usando el menú de configuración del programa *Seasave*.

NOTA. En CARIACO el valor que se calcula es el coeficiente de atenuación de la luz debida a las partículas o relativa al agua, c_p(660), T_w = 100. Para obtener el coeficiente de atenuación de la luz debida a las partículas y al agua (c), se suma a c_p la constante c_w = 0,364 m⁻¹ (Bishop, 1986).

Este ajuste se realiza para corregir la deriva normal del equipo. Si la amplitud del ajuste es muy amplia puede indicar que el equipo presenta una fuerte deriva ó no es posible ajustar el equipo adecuadamente después de varios intentos. Enviar el equipo al fabricante para su revisión y calibración. Verificar el funcionamiento del equipo durante su operación cuando se este midiendo la transmisión de luz en aguas oceánicas muy profundas (> 1000 m) las cuales se encuentran prácticamente libres de partículas. En este caso, el valor del coeficiente de atenuación de la luz se debe aproximar al valor del agua pura c_w = 0,364 m⁻¹. En la estación CARIACO, el mínimo de partículas se encuentra por debajo de los 500 m de profundidad.

4. **Corrección de los datos del fluorómetro.** El objetivo de medir la fluorescencia *in situ* (F) es determinar en tiempo real la distribución de fitoplancton en la columna de agua. El nivel F varía considerablemente en relación directa con la cantidad de clorofila en respuesta a

condiciones ambientales, composición taxonómica y condiciones fisiológicas de las células. **F** se expresa en unidades de voltaje de salida del equipo ó en unidades relativas. Sólo cuando existe una calibración entre muestras *in situ* de clorofila *a* (Chl *a*) y mediciones de **F** es posible reportar la **F** ajustada en unidades de mg m⁻³ o µg L⁻¹ de clorofila. Es importante realizar esta calibración con muestras obtenidas a distintas profundidades dado que la relación entre Cl *a* y **F** varía a lo largo de la columna de agua (Rueda, 2000). Es de notar que los datos del fluorómetro generados durante el procesamiento de datos del CTD se expresan en unidades equivalentes a mg m⁻³ de clorofila debido a que el archivo de configuración del CTD así lo especifica. Esto no significa que sean correctos.

Ajuste

El ajuste se deduce a partir de la expresión:

$$Cl\ a = \frac{F}{(m * z + b)} \quad (9)$$

donde

Cl *a* = concentración de clorofila estimada a partir de la fluorescencia.

F = fluorescencia *in situ* equivalente a mg m⁻³ de clorofila.

z = profundidad (m)

m = pendiente de la recta de regresión lineal.

b = constante de la regresión lineal

Los pasos a seguir son:

- a. Extraer el valor de **F** del archivo .BTL a las mismas profundidades en las que se obtuvieron muestras discretas de Cl *a*, ocho en el caso de CARIACO.
- b. Calcular la relación **F**/Cl *a* para cada profundidad discreta.
- c. Graficar el valor de la relación **F**/Cl *a* vs. profundidad. Calcular la correlación y la regresión lineal de este grupo de datos. La correlación puede ser fuerte ó débil, así como el signo de la regresión puede tener un signo positivo ó negativo.
- d. Usando una hoja de cálculo, copiar las columnas con los valores de profundidad y el valor de **F** del archivo .CNV. En una tercera columna calcular la **F** corregida (**F**_{corr}).

$$F_{\text{corr}} = \frac{F}{(m * z + b)} \quad (10)$$

- e. Graficar los datos de **F** sin corregir, junto con **F**_{corr} y las muestras discretas. Examinar si los datos corregidos coinciden con las muestras discretas. En la mayor parte de los casos el ajuste es aceptable.

Referencias

- Bishop, J. K. (1986). The correction and suspended particulate matter calibration of Sea Tech transmissometer data. *Deep Sea Research Part A. Oceanographic Research Papers*, Volume 33 (1): 121-134.
- Rueda, D. (2000). “Variabilidad temporal de la distribución vertical de la biomasa fitoplanctónica de la depresión Oriental de la Cuenca de Cariaco y sus relaciones con los aspectos hidrográficos del estrato superficial mezclado (1996-1998)”. Tesis de Magíster Scientarium, Universidad de Oriente. Cumaná, 133 pgs.
- SeaBird Electronics, Inc. (2008). Training materials for downloading.
<<http://www.seabird.com/training/TrainingHandouts.htm>> [14/abr/2008].

Método 3. Determinación de Salinidad

Yrene M. Astor

Introducción

Este procedimiento describe el método para determinar la salinidad en agua de mar para aguas dentro de un rango de 0.004 a 76 mS cm⁻¹ (salinidad 2 - 42).

Fundamentos del Método

La Escala de Salinidad Práctica 1978 (PSS 78) define la salinidad del agua de mar como la relación de conductividad eléctrica (K_{15}) de una muestra de agua de mar a una temperatura de 15 °C y 1 atm de presión con respecto a la conductividad eléctrica de una solución de KCl, donde la fracción de masa de KCl es 32,4356 g kg⁻¹ de solución a igual temperatura y presión (Lewis y Perkins, 1981). El salinómetro es el instrumento usado para realizar esta medición a temperatura constante. Este instrumento compara constantemente la conductancia de la muestra de agua de mar con una conductancia integral de referencia (agua de mar estándar IAPSO).

Interferencias

1. La conductividad es una medida de la movilidad de los iones para llevar una carga a través de una solución. Como está en función de la temperatura se deben hacer todas las medidas a una temperatura constante. La temperatura es importante conocerla ya que a mayor temperatura se incrementa el movimiento termal entre los iones y se produce un ascenso de la conductividad.

Materiales

1. Botellas de vidrio transparente de 250 ml con tapa y tapón plástico que cierren herméticamente. Las botellas se mantienen con agua de muestreos anteriores para prevenir la formación de cristales de sal debido a la evaporación y mantener un equilibrio con el vidrio (Knap *et al.*, 1997). Cada seis meses lavar las botellas con HCl al 10% y agua destilada.

Equipo

1. Salinómetro *Guildline*, modelo Portasal[®] 8410A. Rango de medida: 0,004 - 76 mS cm⁻¹ con una resolución de $\pm 0,0003$ mS cm⁻¹ (a S = 35 y 15 °C). Exactitud $\pm 0,003$ unidades de salinidad práctica.

Reactivos

1. *Agua de mar estándar IAPSO* para la calibración del instrumento.

Captación de Muestras

1. Descartar la muestra anterior y enjuagar la botella tres veces con el agua nueva. Una vez lavada, llenar la botella hasta el cuello, secar la boca y la tapa de la botella con una servilleta antes de cerrar. Captar una ó dos replicas en cada perfil.
2. Tapar firmemente y guardar las botellas en un sitio alejado de la luz, a temperatura ambiente y en posición vertical. Los análisis de las muestras se deben realizar a más tardar un mes después de la recolección.

Análisis de las Muestras

1. El salinómetro se enciende y se calibra según las recomendaciones del fabricante (Guildline Instruments, 2006) empleando agua de mar estándar IAPSO. Una solución estándar se emplea para calibrar el equipo al comienzo del análisis, y una segunda al final para verificar la deriva del aparato.
2. Las muestras son abiertas solo en el momento del análisis.
3. Agitar el frasco sin producir burbujas para eliminar cualquier gradiente presente en la botella antes de abrirla. A cada muestra se le realizan tres mediciones de manera consecutiva.

Cálculo y Expresión de Resultados

Los cálculos de salinidad están basados en la definición de salinidad práctica (Lewis and Perkins, 1981; UNESCO, 1981).

Control de Calidad

Las salinidades resultantes se grafican y comparan con las salinidades medias $\pm 2\sigma$ para cada profundidad calculadas a partir de las muestras discretas obtenidas a través del tiempo con la Serie de Tiempo. Igualmente se comparan con las salinidades que se derivan de los lances de bajada del CTD de manera de poder eliminar cualquier dato anómalo. Los duplicados de las muestras profundas concuerdan en $\pm 0,003$ unidades de salinidad de un crucero al siguiente.

Referencias

- Guildline Instruments. (2006). Technical Manual for 'Portasal' Laboratory Salinometer Model 8410, 84 pgs.
- Knap, A.H.; Michaels, A. F.; Steinberg, D.; Bahr, F.; Bates, N.; Bell, S.; Countway, P.; Close, A.; Doyle, A.; Dow, R.L.; Howse, F.; Gundersen, K.; Johnson, R.; Kelly, R.; Little, R.; Orcutt, K.; Parsons, R.; Rathbun, C.; Sanderson, M.; Stone, S. (1997). BATS methods manual. Version 4. U.S. JGOFS Planning Office, Woods Hole, 136 pgs.
- Lewis, E.L.; Perkins, R.G.. (1981). "The Practical Salinity Scale 1978: Conversion of existing data". *Deep-Sea Research*. 28 A (4): 307-328.
- UNESCO. (1981). "Tables océanographiques internationales". 3rd volume. *Unesco Technical Papers in Marine Science*, 39, 35 pgs.

Método 4. Determinación de Sulfuro de Hidrógeno

Xiaona Li e Yrene Astor

Introducción

Este procedimiento describe el método para determinar sulfuro disuelto (H_2S , HS^- y S^{2-}) en agua de mar utilizando medidas espectrofotométricas según el método descrito por Cline (1969) y modificado según Hayes *et al.* (2006). Los resultados se expresan en $\mu\text{mol L}^{-1}$ de S^{2-} en agua de mar. El rango de concentración del método es entre 0 y $1000 \mu\text{mol L}^{-1}$. La precisión del método es de 3,3% y el límite de detección del análisis es de $0,6 \mu\text{mol L}^{-1}$.

Fundamentos del Método

El sulfuro de hidrogeno presente en la muestra de agua de mar reacciona con una solución de cloruro férrico y N,N-dimetil-p-fenilen sulfato de diamina en medio ácido para formar azul de metileno el cual se mide por un método espectrofotométrico.

Interferencias

1. La presencia de burbujas, la agitación y la manipulación de la muestra puede introducir errores en el resultado debido a que se puede introducir oxígeno en la muestra.
2. La solución patrón y la solución estándar de sulfuro son muy inestables y la concentración de esta última varía rápidamente (antes de agregar la solución fijadora de $\text{Zn}(\text{Ac})_2$). Es importante realizar el análisis en menos de 2 horas después de añadir la solución de diamina.
3. El desarrollo del color depende del pH de la muestra; por lo tanto, se efectúan diluciones con agua de mar libre de sulfuro para controlar el pH.
4. La presencia de tiosulfato en la muestra puede inhibir la reacción que desarrolla el color.

Materiales

1. Pipeta automática monocanal con capacidad de 5 mL.
2. Viales con capacidad de 20 mL.
3. Jeringa de vidrio de 10 mL (Hamilton “gas-tight”) con punta de embolo de Teflon[®]. Esta jeringa se debe probar antes de usar para verificar que las burbujas se pueden expulsar fácilmente de la misma. Algunas jeringas están elaboradas de manera tal que resulta difícil deshacerse de las burbujas; por lo tanto, es recomendable comprar varios tipos diferentes de jeringas y probarlas antes del trabajo de campo.
4. Jeringa de plástico de 60 mL con una manguera Tygon[®] de 60 cm de longitud conectada en su punta.
5. Manguera transparente Tygon[®] para la captación de muestra de la botella Niskin, con diámetro no mayor de 4 mm. Colocar un fragmento de manguera de silicona del mismo diámetro adherida a la punta que entra en contacto con la espita en caso de que se pretenda tomar muestras de carbono orgánico disuelto ó total posteriormente. Se debe sumergir la

manguera en agua de mar limpia por 24 horas antes del crucero para minimizar la cantidad de burbujas que se adhieren a la manguera durante la recolección de la muestra.

Equipos

1. Espectrofotómetro con rango en el visible, equipado con celdas que posean una longitud óptica de 1 y 10-cm.

Reactivos

Dependiendo de la concentración de sulfuro presente en la muestra, las concentraciones de los reactivos y los factores de dilución varían. Ver Cline (1969) para muestras con una concentración menor de 3 ó mayor de 40 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Los reactivos que aquí se especifican son para usarlos en muestras que tengan una concentración entre 3 y 40 $\mu\text{mol L}^{-1}$.

1. **Solución de acetato de cinc (0,05 M).** Pesar 1,1 g de acetato de cinc ($\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2$, $\text{Zn}(\text{Ac})_2$) y disolver en 100 mL de agua destilada. El reactivo es estable y se usa como fijador del sulfuro.
2. **Solución mezclada de diamina (concentraciones de sulfuro entre 0 y 44 $\mu\text{mol L}^{-1}$).** Pesar 4,0 g de cloruro férrico calidad analítica (FeCl_3) y 1,6 g de N,N-dimetil-p-fenilén sulfato de diamina ($\text{C}_8\text{H}_{12}\text{N}_2\text{H}_2\text{O}_4\text{S}$, peso molecular: 234,28 g mol^{-1}). Agregar a 100 mL de HCl 6N y mezclar. El reactivo es estable por un mes si se almacena en una botella ámbar a 4°C.
3. **Gas nitrógeno de alta pureza.**
4. **Agua destilada libre de oxígeno.** Para preparar hervir el agua destilada y esperar que alcance temperatura ambiente mientras se le burbujea gas nitrógeno.
5. **Solución patrón de sulfuro.** Preparar justo antes de comenzar el análisis. Colocar 250 mL de agua destilada libre de oxígeno aún caliente (para minimizar difusión de oxígeno) en un matraz volumétrico de 250 mL, e igualmente colocar 90 mL de agua destilada libre de oxígeno en un matraz volumétrico de 100 mL, burbujear gas nitrógeno en ambos matraces mientras el agua alcanza la temperatura ambiente. Secar el reactivo con una servilleta que no deje fibras y pesar una cantidad aproximada a 0,5 g de sulfuro de sodio ($\text{Na}_2\text{S}\cdot 9\text{H}_2\text{O}$) de calidad analítica. Anotar el peso exacto del reactivo para calcular la concentración de la solución patrón y del estándar. Añadir el reactivo al matraz de 250 mL, mezclar y completar hasta el aforo con agua destilada libre de oxígeno. Disolver el sulfuro completamente bajo una atmósfera de nitrógeno. Añadir 5 mL de la solución patrón al otro matraz volumétrico de 100 mL y diluir. Usar inmediatamente. Durante la preparación del patrón, el reactivo debe permanecer en contacto con el aire el mínimo tiempo posible; por ende, tanto el procedimiento de pesado como la disolución en el matraz deben ejecutarse rápidamente. Esta solución, así como la solución estándar son muy inestables; por lo tanto, la preparación de la solución patrón así como la elaboración de la curva de calibración se deben hacer en forma simultánea en un periodo de tiempo breve.
6. **Solución de ácido sulfúrico (1:1, v/v).**
7. **Indicador.** Disolver 1 g de almidón soluble en 100 mL de agua destilada y calentar hasta que desaparezca la turbiedad. Añadir algunas gotas de cloroformo como preservativo y

refrigerar. Esta solución es estable por 2 semanas. Renovar nuevamente si no se obtiene un color azul puro cuando se titula.

8. **Solución de tiosulfato de sodio (0,01 N).** Disolver 2,48 g de tiosulfato de sodio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) en 1000 mL de agua destilada. Esta solución es bastante inestable; por lo tanto, preparar antes de cada análisis y mantener en una botella ámbar en el refrigerador si no se usa inmediatamente. Normalizar todos los días.
9. **Solución de yodato de potasio (0,01 N).** Secar el yodato de potasio (KIO_3) en una estufa a 105 °C por una hora, enfriar en un desecador y pesar exactamente 0,3567 g. Disolver en agua destilada y ajustar el volumen a 1000 mL. Esta solución es estable indefinidamente si se evita la evaporación.
10. **Solución de yoduro de potasio.** Disolver 20 g de yoduro de potasio (KI) en 100 mL de agua destilada.

Captación de Muestras

Las muestras se toman por triplicado y son las primeras que salen de la botella Niskin. Si los sulfuros entran en contacto con oxígeno se oxidan ó volatilizan rápidamente, por lo que es importante tomar las precauciones necesarias para evitar que esto suceda.

1. La muestra se capta colocando la jeringa de plástico de 60 mL con su manguera en un soporte universal mientras se conecta la manguera a la espita de la botella Niskin (Figura 4.1). Durante la captación permitir que el flujo ascienda por la jeringa mientras se llena. Mantener el flujo a una velocidad moderada mientras se realiza la captación lo que minimiza el contacto con el aire y la formación de burbujas. Colocar la punta de la jeringa de vidrio por debajo de la superficie del agua que fluye en forma ascendente y lavar la jeringa de vidrio tres veces con agua de la muestra. Remover cualquier burbuja atrapada después del primer enjuague. Recolectar 4 mL de muestra manteniendo el tiempo de contacto entre el embolo y la muestra al mínimo. Evitar la formación de burbujas durante la captación.
2. Colocar la muestra en un vial de 20 mL levemente inclinado el cual contiene 0,5 mL de $\text{Zn}(\text{Ac})_2$ como agente fijador. La inclinación reduce el tiempo de reacción entre el sulfuro en la muestra y el $\text{Zn}(\text{Ac})_2$. Tapar inmediatamente y agitar suavemente asegurandose que cualquier residuo de $\text{Zn}(\text{Ac})_2$ sea incluido en la mezcla.
3. Refrigerar la muestra a 4 °C a resguardo de la luz tan pronto como sea posible. A esta temperatura, la muestra puede permanecer almacenada hasta por un mes.
4. En una botella de plástico de 100 mL, captar suficiente agua a una profundidad con una alcalinidad similar al de la muestra de manera de garantizar un sistema amortiguador similar tanto en las muestras como en las soluciones estándares. Filtrar y almacenar a 4 °C. Esta agua **libre de sulfuro** se oxigena y emplea para el control del pH en las diferentes diluciones que se realizan tanto a las muestras como a las soluciones estándar.

Análisis de Muestras

Encender el espectrofotómetro 15 minutos antes de comenzar el análisis para que estabilice.

1. Las muestras deben alcanzar la temperatura ambiente antes de iniciar el análisis.
2. Añadir 0,05 mL (50 μ L) de la solución mezclada de diamina con una pipeta automática. Tapar inmediatamente e invertir el vial.
3. Permitir que la solución repose por 20 minutos protegida de la luz.
4. Diluir la muestra con 5 mL de agua de mar libre de sulfuro. Tapar rápidamente y mezclar. Permitir que la solución repose nuevamente por 15 minutos protegida de la luz.
5. Medir la absorción en la celda de 1 cm a una longitud de onda de 670 nm para muestras que contengan concentraciones de sulfuro mayores de 3 μ mol L⁻¹. Para aquellas con concentraciones menores de 3 μ mol L⁻¹ emplear una celda de 10-cm.
6. Las muestras con concentraciones elevadas de sulfuro se pueden diluir una vez desarrollado el color totalmente. Sin embargo, esto no es recomendable ya que aumenta la incertidumbre del método. La absorción mas alta debería ser menor de 0,8 ya que las soluciones acuosas de azul de metileno con concentraciones elevadas no se ajustan a la ley de Beer (Cline, 1969).

Calibración

1. Para optimizar el análisis, el rango de concentración de la curva de calibración se mantiene dentro del rango esperado en las muestras a estudiar. Ver Cline (1969) para mas detalles acerca de la preparación de los reactivos y los factores de dilución para concentraciones mayores de 40 μ mol L⁻¹.
2. **Soluciones para la curva de calibración.** Para un rango de concentración de sulfuro entre 0 a 40 μ mol L⁻¹ se agrega 0,1; 0,2; 0,3 y 0,4 mL de la solución estándar en viales que contengan 0,5 mL de Zn(Ac)₂.
3. Diluir con 4 mL de agua de mar libre de sulfuro, y añadir con una pipeta automática 0,05 mL (50 μ L) de la solución mezclada de diamina. Tapar e invertir los viales.
4. Permitir que los estándares diluidos reposen por 20 minutos protegidos de la luz.
5. Diluir con otros 5 mL de agua de mar libre de sulfuro, y permitir que reposen nuevamente por 15 minutos más protegidos de la luz.
6. Medir la absorción en una celda de 1 cm a una longitud de onda de 670 nm. La concentración de sulfuro en cada vial se calcula a partir de la cantidad de sulfuro de sodio añadido y de los factores de dilución.

Calibración de la Solución Estándar

La calibración de la solución estándar se hace inmediatamente después de su preparación:

1. Añadir 10 mL de la solución de ioduro de potasio y 10 mL de yodato de potasio a seis matraces erlenmeyer con tapa biselada.
2. Agregar 1 mL de H₂SO₄ a cada matraz.
3. Con una pipeta volumétrica calibrada, añadir 50 mL de la solución estándar de sulfuro a tres de los matraces, y 50 mL de agua destilada libre de oxígeno a los otros tres matraces.
4. Permitir reposar por 10 minutos.
5. Titular con tiosulfato de sodio empleando una solución de almidón como indicador.
6. El volumen de tiosulfato empleado entre replicas no debe variar de $\pm 0,05$ mL.

7. Calcular la cantidad de H₂S presente en la solución con la formula:

$$\mu\text{mol L}^{-1} \text{H}_2\text{S} = 10^6 * M * \frac{(A - B)}{2V} \quad (1)$$

donde

A = media de las replicas de las tres soluciones sin sulfuro, en mL.

B = media de las replicas de las tres soluciones con sulfuro, en mL.

V = volumen de la solución estándar de sulfuro, 50 mL.

M = concentración de la solución de tiosulfato (mol L⁻¹).

Análisis del Blanco

La cantidad de sulfuro de hidrógeno en el agua de mar con oxígeno es insignificante; por lo tanto, se puede emplear como blanco.

1. Colocar en un vial 0,5 mL de Zn(Ac)₂ y añadir 4 mL de agua de mar libre de sulfuro.
2. Añadir 0,05 mL de la solución mezclada de diamina con una pipeta automática. Tapar y mezclar.
3. Permitir que la solución repose por 20 minutos.
4. Medir la absorción en una celda de 1 cm a una longitud de onda de 670 nm. El valor obtenido depende de la pureza y concentración del reactivo, turbiedad de la muestra y la diferencia entre celdas (Cline, 1969).

Cálculo y Expresión de Resultados

La cantidad de sulfuro de hidrógeno disuelto en agua de mar se calcula con la siguiente ecuación:

$$[\text{H}_2\text{S} (\mu\text{mol L}^{-1})] = \frac{2,388 - (\text{Abs}_m - \text{Abs}_b)}{p} \quad (2)$$

donde

2,388 = factor de dilución (calculado a partir de los volúmenes del Zn(Ac)₂ + muestra + agua libre de sulfuro + solución de diamina)/4.

Abs_m = absorción de la muestra.

Abs_b = absorción del blanco.

p = pendiente de la curva lineal de calibración calculada a partir de los sub-estándares con extinciones menores de 0,8.

Referencias

- Cline, J.D. (1969). "Determination of hydrogen sulfide in natural water". *Limnology and Oceanography*. 14(3): 454-458.
- Hayes, M.K.; Taylor, G.T. (2006). "Vertical distributions of thiosulfate and sulfite in the Cariaco Basin". *Limnology and Oceanography*. 51(1): 280-287.

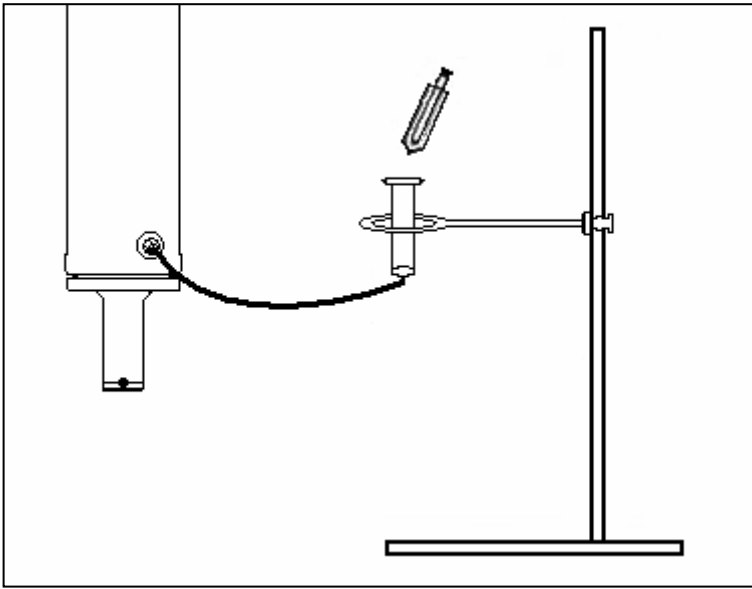


Figura 4.1. Método de captación de la muestra para H₂S.

Método 5. Determinación de Oxígeno Disuelto

Yrene M. Astor

Introducción

Este procedimiento describe el método para determinar la concentración de oxígeno disuelto en agua de mar. La técnica utiliza un sistema de titulación automático basado en el método Winkler (Carpenter 1965), modificado por Aminot y Chaussepied (1983). El límite de detección es 0.06 mL I^{-1} , y la precisión del método es de $\pm 0,03 \text{ mL L}^{-1}$.

Fundamentos del Método

El oxígeno disuelto presente en la muestra reacciona con manganeso en un medio altamente alcalino generando un precipitado ($\text{MnO}(\text{OH})_2$). La muestra se acidifica a un pH entre 1,0 y 2,5 con lo cual se disuelve el precipitado y se libera yodo en cantidades químicamente equivalentes al contenido de oxígeno disuelto en la muestra original. El yodo liberado se valora utilizando una solución estándar de tiosulfato de sodio la cual convierte todo el yodo libre en yoduro. Una solución indicadora (almidón) detecta el punto final de la titulación. Con este método, cuatro moles de tiosulfato equivalen a un mol de oxígeno disuelto (Aminot and Chaussepied, 1983).

Interferencias

1. En las aguas que tienen concentraciones elevadas de agentes oxidantes y/o reductores (hierro, sulfito, tiosulfato, nitrito, etc.) se presentan interferencias positivas ó negativas. Compuestos orgánicos susceptibles a fijar el yodo así como sustancias oxidables en medio básico son otra fuente de error (Aminot y Chaussepied, 1983).
2. La introducción de burbujas de aire dentro de la botella así como en la manguera de captación produce interferencia positiva.
3. El trasvase de la muestra así como la agitación vigorosa favorece la disolución de aire en la muestra y la pérdida de yodo debido a su volatilidad. Esto se evita titulando en el mismo matraz en que se hace la captación.
4. La titulación debe hacerse rápidamente para evitar la oxidación del yoduro a yodo debido al contacto con la atmósfera.
5. Las aguas que presenten niveles elevados de color debido a la presencia de materia orgánica así como de turbiedad dificultan la visualización del punto final de la titulación.

Materiales

1. Pipetas aforadas (10 y 100 mL).
2. Dispensadores automáticos con capacidad de 0 a 2,0 mL.
3. Pipetas automáticas monocanal con capacidad de 1 mL.
4. Matraces Pyrex de 125 mL utilizados para la determinación de yoduro, con tapa cónica biselada que se proyecte por encima del sello. Lavar previamente los matraces con agua destilada y secarlos totalmente. Cada matraz y su tapa se deben identificar y mantener

juntos en todo momento. El volumen del matraz con la tapa puesta se debe calcular en forma gravimétrica (ver sección **Determinación del Volumen de Muestra**).

5. Mangueras Tygon[®] para la captación de muestra de la botella Niskin, con diámetro no mayor de 4 mm. Usar manguera de silicona del mismo diámetro en caso de que se pretenda tomar muestras de carbono orgánico disuelto ó total (DOC y/ó TOC) seguidamente.

Equipos

1. Bureta de émbolo con una resolución de 0,01 mL.
2. Agitador magnético.
3. Balanza analítica, con apreciación de 0,1 mg.

Reactivos

1. **Solución manganosa.** Disolver 600 g de cloruro de manganeso tetrahidratado ($\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{HO}_2$), ó 670 g de sulfato de manganeso tetrahidratado ($\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{HO}_2$), ó 560 g sulfato de manganeso bihidratado ($\text{MnSO}_4 \cdot 2\text{HO}_2$), ó 510 g de sulfato de manganeso monohidratado ($\text{MnSO}_4 \cdot \text{HO}_2$) en 1000 mL de agua destilada. Mantener a temperatura ambiente.
2. **Solución alcalina de ioduro.** Disolver 320 g de hidróxido de sodio (NaOH) en 300 mL de agua destilada. Disolver 600 g de ioduro de sodio (NaI) en 300 mL de agua destilada mientras se calienta la solución. Mezclar las dos soluciones a temperatura ambiente y ajustar el volumen a 1000 mL. Si las muestras poseen nitrito en cantidades $> 3 \mu\text{mol L}^{-1}$, añadir 10 g de azida de sodio (NaN_3) disueltos en 40 mL de agua destilada antes de ajustar el volumen. Mantener a temperatura ambiente.
3. **Solución de ácido sulfúrico.** Diluir 280 mL de ácido sulfúrico concentrado (H_2SO_4 , $d = 1,84 \text{ g mL}^{-1}$) en agua destilada. Ajustar el volumen a 1000 mL.
4. **Indicador.** Disolver 1 g de almidón soluble en 100 mL de agua destilada y calentar hasta que desaparezca la turbiedad. Añadir algunas gotas de cloroformo como preservativo y refrigerar. Esta solución es estable por 2 semanas. Renovar nuevamente si no se obtiene un color azul puro cuando se titula.
5. **Solución estándar de tiosulfato (0,01 N).** Disolver 2,48 g de tiosulfato de sodio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) en 1000 mL de agua destilada. Esta solución es bastante inestable; por lo tanto, preparar antes de cada análisis y mantener en una botella ámbar en el refrigerador si no se usa inmediatamente. Normalizar todos los días.
6. **Solución estándar de yodato de potasio (0,01 N).** Secar el yodato de potasio (KIO_3) en una estufa a $105 \text{ }^\circ\text{C}$ por una hora, enfriar en un desecador y pesar exactamente 0,3567 g. Disolver en agua destilada y ajustar el volumen a 1000 mL. Esta solución es estable indefinidamente si se evita la evaporación.

Determinación del Volumen de Muestra

Es importante conocer con precisión el volumen de muestra en cada matraz. Los volúmenes se obtienen por peso de la manera siguiente:

1. Numerar cada matraz junto con sus tapas.
2. Lavar y enjuagar cada matraz con agua destilada, secar aproximadamente a 100 °C en una estufa y permitir que alcancen temperatura ambiente.
3. Pesar cada matraz con su tapa.
4. Llenar el matraz con agua destilada y tapanlos sin que queden burbujas de aire adentro. Secar totalmente, especialmente alrededor de la tapa y en los bordes, con un papel absorbente.
5. Pesar los matraces llenos.
6. Medir la temperatura del agua destilada en los matraces.
7. Calcular el volumen del agua según la relación:

$$V_{(mL)} = \frac{P_2 - P_1}{D} \quad (1)$$

donde

P_1 = peso del matraz vacío (g).

P_2 = peso del matraz con agua destilada (g).

D = densidad del agua destilada a la temperatura de la medición ($g\ mL^{-1}$).

La densidad del agua destilada a diferentes temperaturas se muestra en la Tabla 5.1.

Captación de Muestras

1. Las muestras para oxígeno disuelto se captan de las botellas Niskin después de recolectar las de sulfuro de hidrógeno. Las muestras se toman por duplicado.
2. Para la extracción de la muestra se utiliza una manguera flexible transparente conectada a la espita de la botella Niskin. Esto reduce la introducción de burbujas de aire mientras se capta la muestra. Elevar el extremo final de la manguera, abrir el paso de agua y remover las burbujas de aire presionando la manguera con los dedos. Colocar el matraz de forma invertida e introducir el tubo hasta el fondo del mismo. Enjuagar el matraz y su tapa con la muestra dos veces. Poner el matraz en posición vertical y permitir que el agua desborde. Para calcular cuanta agua debe rebosar, estimar primero cuanto tarda el frasco en llenarse y seguidamente permitir que el agua siga fluyendo por un periodo equivalente a dos veces ese tiempo, mientras se golpea con la tapa la parte inferior del matraz para evitar que alguna burbuja se adhiera al vidrio. Para retirar la manguera, bajar el matraz lentamente hasta que la manguera se encuentre ~1 cm por debajo de la superficie del agua. Cerrar el flujo y retirar la manguera del matraz con cuidado.
3. Antes de colocar la tapa, añadirⁱ inmediatamente 0,8 mL de solución manganosa y 0,8 mL de solución alcalina, colocando la punta de cada dispensador por debajo de la superficie de la muestra tratando de evitar la formación de burbujas mientras se agregan los reactivos. Colocar cuidadosamente la tapa correspondiente al matraz, sin que queden burbujas dentro del mismo, y agitar al menos 15 veces invirtiendo el frasco. Permitir que se forme el precipitado después de 20 minutos y agitar nuevamente.

ⁱ La dosis de cada reactivo dependerá del volumen del matraz usado a razón de 6 mL por cada litro de muestra

4. Colocar agua de mar en la copa alrededor de la tapa para evitar la resequedad del esmerilado y la difusión del gas. Guardar el matraz a temperatura ambiente protegido de la luz.
5. Analizar las muestras en un periodo no mayor de 24 horas después de la captación.

Análisis de Muestras

1. Antes del análisis permitir que las muestras y los reactivos alcancen temperatura ambiente.
2. En el laboratorio, se debe retirar el agua que se encuentra alrededor de la tapa del matraz antes de empezar el análisis, procurando no provocar turbulencia en la muestra que pueda perturbar el precipitado. Remover la tapa cuidadosamente y añadir 0,8 mL de la solución de ácido sulfúrico. Mezclar la solución con un agitador magnético para disolver el precipitado completamente.
3. Realizar la titulación en el transcurso de una hora. Titular directamente en el matraz con tiosulfato de sodio 0,01 N hasta obtener un color amarillo pálido.
4. Añadir 1 mL de la solución de almidón con lo cual la solución se torna de un color azul. Continuar lentamente la titulación hasta que la solución se torne transparente y permanezca así por 20 segundos. La titulación no debe tomar más de 3 minutos.

Normalización del Tiosulfato

Se deben realizar un mínimo de tres estándares por cada grupo de muestras.

1. Añadir 10 mL de la solución estándar de yodato de potasio 0,01 N en un matraz limpio.
2. Añadir aproximadamente 100 mL de agua destilada.
3. Añadir 0,8 mL de la solución de ácido sulfúrico y mezclar.
4. Añadir 0,8 mL de la solución alcalina y mezclar.
5. Titular inmediatamente siguiendo los pasos 3 y 4 del **Análisis de Muestras**.

Determinación del Blanco

Blanco del análisis (B_{ana}). Los reactivos pueden contener impurezas oxidantes ó reductoras las cuales se pueden controlar realizando un blanco.

1. Añadir exactamente 1 mL de la solución estándar de yodato de potasio 0,01 N a un matraz muy limpio.
2. Agregar 100 mL de agua destilada con una pipeta volumétrica.
3. Añadir 0,8 mL de la solución de ácido sulfúrico y mezclar.
4. Agregar 0,8 mL de la solución alcalina y mezclar.
5. Por último agregar 0,8 mL de la solución manganosa y mezclar.
6. Titular inmediatamente hasta alcanzar el punto de equivalencia (V_1).
7. Añadir nuevamente 1 mL de la solución estándar de yodato de potasio 0,01 N y titular inmediatamente con tiosulfato (V_2).
8. El blanco del análisis es:

$$B_{ana} = (V_1 - V_2) \quad (2)$$

Blanco del estándar (B_{est}). Hacer el blanco del estándar como se describe para B_{ana} sin agregar la solución manganosa.

Cálculo y Expresión de Resultados

La concentración de oxígeno disuelto se calcula usando la siguiente ecuación:

$$[O_2 \text{ (mL L}^{-1}\text{)}] = 559,8 * \frac{(VT - B_{ana})}{(V_{est} - B_{est})} * (V_{mue} - V_r) - 0,01 \quad (3)$$

donde

VT = volumen de tiosulfato utilizado para titular la muestra.

B_{ana} = blanco del análisis.

V_{est} = volumen medio de tiosulfato utilizado para titular las tres soluciones estándar.

B_{est} = blanco estándar.

V_{mue} = volumen de muestra en el matraz (ver sección **Determinación del Volumen de Muestra**).

V_r = volumen de los reactivos de fijación añadidos al matraz.

Referencias

- Aminot, A.; Chaussepied, M. (1983). Manuel de Analyses Chimiques en Milieu Marin. Francia: Centre National pour L'Exploitation des Océans, 395 pgs.
- Carpenter, J.H. (1965). "The accuracy of the Winkler method for dissolved oxygen analysis". *Limnology and Oceanography*, 10: 135-140.

Tabla 5.1. Densidad del agua destilada a una temperatura t °C.

T (°C)	D (g cm ⁻³)
20	0,99823
22	0,99777
24	0,99730
26	0,99679
28	0,99623
30	0,99567

Método 6. Determinación de pH

Yrene M. Astor

Introducción

Este procedimiento describe el método para determinar pH en agua de mar en la escala de pH de la concentración total de iones de hidrógeno (pH_T), utilizando medidas espectrofotométricas basadas en el procedimiento desarrollado por Clayton y Byrne (1993). Este procedimiento se describe en Dickson *et al.* (2007). La concentración total de iones hidrógeno se expresa en moles por kilogramo de agua de mar. Las mediciones espectrofotométricas de pH son simples, rápidas y precisas (Clayton y Byrne, 1993). La precisión del método es de $\pm 0,001$ unidades de pH. Los niveles elevados de ácido sulfhídrico en aguas anóxicas acortan el tiempo de vida de los electrodos usados por el método potenciométrico; por lo tanto, se aconseja emplear un método espectrofotométrico en este tipo de aguas.

Fundamentos del Método

El pH de una muestra se determina por medios espectrofotométricos agregando un indicador de sulfonftaleína, llamado púrpura de *m*-cresol. El método se basa en medir el espectro de absorbancia del indicador el cual tiene un valor de $\text{p}K$ que gira alrededor del pH del agua de mar y las formas ácidas (HI) y básicas (I^{2-}) del indicador. El nivel de incertidumbre es equivalente a una imprecisión en la concentración total de iones de hidrogeno de $\pm 0,1\%$ donde

$$\text{pH}_T = -\log [\text{H}^+]_T \quad (1)$$

$$[\text{H}^+]_T \cong [\text{H}^+] + [\text{HSO}_4^-] \quad (\text{Byrne } et \text{ al.}, 1999) \quad (2)$$

Cuando se emplean medios espectrofotométricos en el análisis, el pH en la muestra se determina a partir de la formula:

$$\text{pH}_T = \text{p}K_2 + \log_{10} \left[\frac{[\text{I}^{2-}]}{[\text{HI}^-]} \right] \quad (3)$$

donde

$\text{p}K_2$ = constante de disociación para la especie HI^- (expresada sobre la escala de la concentración total de iones de hidrógeno en mol kg-solución).

El cociente $[\text{I}^{2-}]/[\text{HI}^-]$ se estima midiendo la absorbancia de ambas especies a dos longitudes de onda (434 y 578). Para cada longitud de onda correspondiente se usa la absorbancia máxima de la forma básica y ácida del indicador púrpura de *m*-cresol y con ambas se calcula el cociente de absorbancias ($R = A_{578}/A_{434}$) el cual describe hasta donde se extiende la protonación del indicador, respectivamente.

$$\frac{[\text{I}^{2-}]}{[\text{HI}^-]} = \frac{R_{(25)} - 0,00691}{2,222 - (R_{(25)} * 0,1331)} \quad (4)$$

donde

$R_{(25)}$ = cociente de absorbancias (A_{578}/A_{434}) a 25 °C.

A_{λ} = absorbancias corregidas medidas a las longitudes de onda correspondientes a la absorbancia máxima de la forma básica (I^{2-}) y ácida (HI), respectivamente.

Interferencias

1. La temperatura influye en las mediciones espectrofotométricas del pH ya que afecta la constante de formación del HI y las absorptividades molares del indicador púrpura de *m*-cresol; por lo tanto, el análisis se debe realizar a una temperatura de $25 \pm 0,1$ °C.
2. La presencia de burbujas de aire durante la captación puede alterar la muestra. Recolectar tomando las mismas precauciones que se emplean al captar oxígeno disuelto (**Método 5**).
3. Yao *et al.* (2007) comprobó que el púrpura de *m*-cresol posee impurezas que contribuyen a desviaciones aparentes del pH de hasta 0,01 unidades de pH; por lo tanto, se recomienda que el analista mantenga un registro de la fuente y número de lote del indicador de manera de poder efectuar correcciones a los datos una vez que se puedan obtener indicadores con un grado de purificación mayor y se puedan efectuar caracterizaciones más refinadas.

Materiales

1. Manguera de silicona Tygon[®] para la captación de muestra de la botella Niskin, con diámetro no mayor de 4 mm. Se emplea este tipo de manguera para evitar la contaminación de la muestra cuando seguidamente se desee captar muestras de carbono orgánico disuelto ó total (DOC y/ó TOC). Sumergir la manguera en agua de mar limpia por 24 horas antes del crucero para minimizar la cantidad de burbujas que se adhieren a la manguera durante la captación de la muestra.
2. Celdas de vidrio de longitud óptica de 10-cm, con tapas de Teflon[®]. Se deben tener suficientes celdas para todas las muestras y sus duplicados.
3. Jeringa micrométrica marca Gilmont con una exactitud de 0,5%, con un delgado tubo de teflón adherido a la punta para dispensar el indicador.

Equipos

1. Espectrofotómetro para mediciones espectrales con un ancho de banda de 380 – 850 nm.
2. Compartimento termostático para acomodar celdas de 10-cm donde la temperatura se pueda regular dentro de un rango no mayor de $\pm 0,1$ °C.
3. Baño de agua con termocirculador con control de temperatura de $\pm 0,05$ °C que regule la temperatura del compartimento así como de todo el sistema.

Reactivos

1. *Solución púrpura de m-cresol* ($\sim 2 \text{ mmol dm}^{-3}$). Pesar 0,0809 g de púrpura de *m*-cresol, sal de sodio ($C_{21}H_{17}NaO_5S$, peso molecular: 404,41 g mol⁻¹) en 100 mL de agua destilada. Ajustar el pH alrededor de $7,9 \pm 0,1$ unidades de pH antes de cada muestreo.

Captación de Muestras

1. Captar la muestra en celdas de 10-cm después de recolectar la de H₂S y oxígeno disuelto. Una manguera se adapta a la espita de la botella Niskin para captar la muestra de manera de eliminar las burbujas de aire durante la captación y así minimizar esta interferencia. Captar la muestra directamente en la celda.
2. Conectar la manguera a la entrada inferior de la celda y mantener esta última en posición vertical, elevándola por encima de la espita mientras se abre la llave. Permitir que el agua fluya suavemente dentro de la celda mientras se presiona con los dedos la manguera para eliminar las burbujas de aire. Enjuagar la celda tres veces con la muestra.
3. Colocar la celda en posición horizontal y permitir que el agua se desborde al equivalente de dos volúmenes de la celda. Esto se puede estimar contando mientras la celda se llena.
4. Colocar cuidadosamente la tapa de Teflón[®] en una de las aberturas de la celda mientras el agua fluye lentamente a través de la celda, sin permitir que queden burbujas de aire atrapadas dentro. Retirar la manguera y colocar la segunda tapa de Teflón[®].
5. Colocar la celda al resguardo de la luz mientras se captan las siguientes muestras. Analizar inmediatamente.

Análisis de las Muestras

Prender todos los equipos 15 minutos antes de comenzar el análisis para que estabilicen.

1. Colocar las celdas con la muestra en una bolsa Ziploc[®] e introducirla en un baño termostático a 25 °C por 15 minutos.
2. Limpiar y secar el exterior de la celda y colocarla en el compartimento termostático el cual se mantiene a 25 °C.
3. Calibrar el espectrofotómetro con la muestra y añadir 20 µL del indicador púrpura de *m*-cresol directamente a la celda con la micropipeta. Colocar la tapa nuevamente tratando de evitar que queden burbujas atrapadas dentro de la celda y agitar para mezclar la muestra con el indicador.
4. Medir las absorbancias a las siguientes longitudes de onda: 730 nm correspondiente a la longitud de onda no absorbida por el púrpura *m*-cresol, 578 y 434 nm las cuales corresponden a la absorción máxima de la forma básica (I²⁻) y de la forma acida (HI⁻) del indicador.

Cálculo y Expresión de Resultados

El cálculo del pH en agua de mar se obtiene de la siguiente expresión:

$$\text{pH}_T = \text{p}K_2 + \log_{10} \left[\frac{R_{(25)} - 0,00691}{(2,222 - (R_{(25)} * 0,1331))} \right] \quad (5)$$

donde

$\text{p}K_2$ = constante de disociación para la especie HI⁻ (expresada sobre la escala de la concentración total de iones de hidrógeno en mol kg-soln).

$R_{(25)}$ = cociente de absorbancias ($R = A_{578}/A_{434}$) medidas a 25 °C.

La constante de disociación K_2 para el púrpura de *m*-cresol depende de la salinidad y la temperatura y se obtiene a partir de la formula de Clayton y Byrne (1993):

$$pK_2 = \frac{1245,69}{T} + 3,8275 + F + 0,00211 (35 - S) \quad (6)$$

donde

T = temperatura del baño de agua, en grados Kelvin.

S = salinidad de la muestra.

F = corrección según DelValls y Dickson (1998): 0,0047.

Al añadir el indicador se altera el pH; por lo tanto, es necesario calcular un factor de corrección para obtener mejores resultados (ver Dickson *et al.*, 2007).

El cociente de las absorbancias $R_{(25)}$ se obtiene a partir de la formula:

$$R_{(25)} = \frac{(A_{5781} - A_{7301})}{(A_{4341} - A_{7301})} \quad (7)$$

donde

$A_{\lambda I}$ = absorbancia a longitudes de onda de 434, 578 y 730 nm con indicador púrpura de *m*-cresol.

Referencias

- Byrne, R.H.; McElligot, S.; Feely, R.A.; Millero, F.J. (1999). "The role of pH_T measurements in marine CO_2 -system characterizations". *Deep-Sea Research I*. 46: 1985-1997.
- Clayton, T.D.; Byrne, R. H. (1993). "Spectrophotometric seawater pH measurements: total hydrogen ion concentration scale calibration of *m*-cresol purple and at-sea results". *Deep-Sea Research*. 40: 2115-2129.
- DelValls, T.A.; Dickson, A.G. (1998). "The pH of buffers based on 2-amino-2-hydroxymethyl-1,3-propanediol ('tris') in synthetic sea water. *Deep-Sea Research*. 45: 1541 – 1554.
- Dickson, A.G.; Sabine, C.L.; Christian, J.R. (Eds.). (2007). Guide to Best Practices for Ocean CO_2 Measurements. PICES Special Publications 3, 191 pgs.
- Yao, W.; Liu, X.; Byrne, R.H. (2007). "Impurities in indicators used for spectrophotometric seawater pH measurements: Assessment and remedies". *Marine Chemistry*. 107: 167 – 172.

Método 7. Determinación de Alcalinidad Total

Yrene M. Astor

Introducción

Este procedimiento describe el método para la determinación de la alcalinidad total en agua de mar utilizando medidas espectrofotométricas, según lo publicado por Breland y Byrne (1993) y Yao y Byrne (1998), modificado según sugerencias del Dr. Wensheng Yao. Los resultados se expresan en $\mu\text{mol kg}^{-1}$ de agua de mar. La precisión del método es de $\pm 2 \mu\text{mol kg}^{-1}$ y es apta para niveles oceánicos de alcalinidad total entre 2000-2500 $\mu\text{mol kg}^{-1}$.

Fundamentos del Método

Un volumen conocido de agua de mar se acidifica titulando con una solución de HCl 0,1 N hasta alcanzar un pH entre 3,8 y 4,2. A la muestra acidificada se le purga el contenido de CO_2 suministrando gas nitrógeno. El exceso de ácido se cuantifica por medio de mediciones espectrofotométricas usando un indicador de sulfonftaleína, verde de bromocresol. Los máximos de absorción para las especies I^{2-} (616 nm) y HI (444 nm) son los que se extraen de las medidas espectrofotométricas de alcalinidad.

Interferencias

1. La temperatura influye en las mediciones espectrofotométricas de alcalinidad ya que afecta la constante de formación del HI y las absorptividades molares de los indicadores de sulfonftaleína; por lo tanto, el análisis se debe realizar a una temperatura de $25 \pm 0,1$ °C.

Materiales

1. Celdas de vidrio de longitud óptica de 10-cm, con tapas de Teflon[®].
2. Jeringa micrométrica marca Gilmont con una exactitud de 0,5%, calibrada a 2 ml, con una manguera de teflón delgada conectada a la punta para dispensar el indicador.
3. Botellas ámbar de borosilicato de 250 mL, con tapa de rosca, lavadas previamente con detergente y agua desionizada.
4. Jeringa de plástico con capacidad de 5 mL con una manguera de teflón delgada conectada a la punta para dispensar el ácido.
5. Manguera transparente Tygon[®] para la captación de muestra de la botella Niskin con diámetro no mayor de 4 mm. Se debe sumergir la manguera en agua de mar filtrada por 24 horas antes del crucero para minimizar la cantidad de burbujas que se adhieren a la manguera durante la recolección de la muestra.

Equipos

1. Espectrofotómetro para mediciones espectrales con un ancho de banda de 380 – 850 nm.
2. Balanza analítica, con apreciación de 0,001 g.

3. Compartimento termostático para acomodar celdas de 10-cm donde la temperatura se pueda regular dentro de un rango no mayor de $\pm 0,1$ °C.
4. Baño de agua con termocirculador con control de temperatura de $\pm 0,05$ °C que regule la temperatura del compartimento así como de todo el sistema.
5. Agitadores magnéticos.

Reactivos

1. *Cloruro de mercurio saturado.*
2. *Indicador verde de bromocresol* ($\sim 2 \times 10^{-3}$ M). Pesar 0,216 g de verde de bromocresol, sal de sodio ($C_{21}H_{13}Br_4NaO_5S$, peso molecular: $720,06 \text{ g mol}^{-1}$) y diluir a 100 ml con agua destilada. Ajustar el pH de la solución a menos de 4,5.
3. *Ácido clorhídrico, 0,1 N.* Diluir 8,3 ml de ácido clorhídrico (HCl concentrado al 38%) en agua destilada. Completar a un litro.
4. *Gas nitrógeno de alta pureza.*
5. *Material de referencia de grado primario para mediciones de CO_2 oceánico.* Suministrado por el profesor Andrew G. Dickson del Marine Physical Laboratory (7110 Via Capri. La Jolla, California. 92037-3917, USA).

Captación de Muestras

1. Conectar una manguera Tygon[®] a la espita de la botella Niskin para captar la muestra. Abrir el paso de agua colocando la manguera en el fondo de una botella ámbar, lavar tres veces con la muestra, y llenar permitiendo que el agua desborde de la botella. Para calcular cuanta agua debe rebosar, estimar primero cuanto tarda el frasco en llenarse y seguidamente permitir que el agua siga fluyendo por un periodo equivalente a dos veces ese tiempo.
2. Para sacar la manguera, levantarla hasta cerca del borde, cerrar el paso de agua y retirar la manguera. Esta técnica deja un espacio de aire en la botella de aproximadamente 2,5 mL (1% del volumen total de la botella) lo que permite la expansión del agua por cambios de temperatura.
3. Añadir con una pipeta automática 50 μL (0,02% del volumen total de muestra) de una solución de cloruro de mercurio saturado, con el fin de inhibir la actividad biológica.
4. Tapar la botella y agitar levemente para mezclar bien.
5. Refrigerar, no congelar. Realizar duplicados de por lo menos tres profundidades diferentes en cada estación. La muestra puede permanecer refrigerada por un máximo de tres meses.

Análisis de las Muestras

Encender todos los equipos 15 minutos antes de comenzar el análisis para que estabilicen. Verificar el pH del indicador ($< 4,5$) y calibrar la balanza analítica. Permitir que las muestras, la solución estándar y los reactivos alcancen temperatura ambiente antes del análisis. Durante la manipulación de los matraces y las jeringas, las manos deben permanecer limpias y secas. El siguiente procedimiento se realiza tanto a las muestras como a las soluciones estándares:

Medición de las absorbancias antes de la titulación.

1. Colocar la celda que contiene la muestra ó la solución estándar sin procesar en una bolsa Ziploc[®] e introducirla en un baño termostático a 25 °C por 15 minutos.
2. Limpiar y secar el exterior de la celda y colocarla en el compartimento termostático del espectrofotómetro el cual se mantiene a 25 °C.
3. Medir las absorbancias a las siguientes longitudes de onda: 444, 616 y 750 nm.

NOTA. Usar la misma celda para medir las absorbancias antes y después de la titulación. Los duplicados se deben medir en la misma celda.

Titulación

1. Pesar con una precisión de 0,01 g suficientes matraces vacíos de 125 mL según el número de muestras y soluciones estándares que se van a analizar.
2. Añadir 100 mL de muestra (ó solución estándar) a un matraz con una pipeta volumétrica colocando la punta en el fondo del mismo.
3. Pesar el matraz con la muestra (ó solución estándar). La diferencia de peso entre el matraz lleno y el matraz vacío representa el volumen de muestra (V_m).
4. Mientras se agita la solución, añadir con una micropipeta 80 μ L del indicador verde de bromocresol.
5. Pesar con una precisión de 0,001 g una jeringa plástica que contenga HCl 0,1 N, y titular.
6. Añadir ácido lentamente a la muestra mientras se agita hasta obtener un color verde amarillento (pH entre 3.8 y 4.2). Colocar la punta de la manguera dispensadora muy cerca de la superficie del líquido evitando salpicaduras de modo que se efectúe la mezcla total del ácido con la muestra.
7. Al terminar de titular, pesar de nuevo la jeringa. La diferencia de peso antes y después de la titulación representa el volumen de ácido agregado al titular (V_a).
8. Burbujear gas nitrógeno a la muestra (ó solución estándar) por 5 minutos mientras se continua con la agitación.

Medición de las absorbancias después de la titulación.

1. Colocar la muestra (ó solución estándar) ya procesada en la misma celda que se empleo para medir las absorbancias antes de la titulación, y meterla en un baño termostático a 25 °C por 15 minutos dentro de una bolsa Ziploc[®].
2. Limpiar y secar el exterior de la celda y colocarla en el compartimento termostático el cual se mantiene a 25 °C.
3. Medir las absorbancias a las siguientes longitudes de onda: 444, 616 y 750 nm.

Cálculo y Expresión de Resultados

La absorbancia que se mide a 750 nm se usa para controlar y corregir cualquier desviación de la línea base. La forma de colocar la celda en el compartimento termostático así como la deriva del equipo puede causar un cambio en la línea base; por lo tanto, se mide la absorbancia a una longitud

de onda en la cual no ocurra absorción (750 nm para el verde de bromocresol) y se sustrae la misma de las absorbancias medidas para la muestra (ó solución estándar). La diferencia entre la absorbancia antes y después de la titulación a 750 nm no debe ser mayor de $\pm 0,001$.

La alcalinidad total se calcula usando la siguiente ecuación:

$$(AT)_m = \frac{\{(M_a V_a) - [(H^+)_T V_{ma}]\} \times 1000}{V_m} \quad (1)$$

donde

$(AT)_m$ = alcalinidad total en $\mu\text{mol kg}^{-1}$.

M_a = concentración del HCl añadido durante la titulación.

$$M_a = 10^{-\text{pH}_{\text{agm}}} * \frac{(V_m + V_a)}{V_m} + AT_{\text{est}} + \frac{V_m}{V_a} \quad (2)$$

V_m = volumen (ó masa) de la muestra de agua de mar antes de la titulación.

V_a = volumen (ó masa) del ácido añadido.

V_{ma} = volumen (ó masa) del agua de mar después de la titulación = $V_m + V_a$.

AT_{est} = alcalinidad total de estándar (Marine Physical Laboratory) según planilla de certificado del estándar.

$(H^+)_T$ = concentración total del exceso de iones de hidrógeno en la muestra después de remover completamente el $\text{CO}_2 = [10^{-\text{pH}_{\text{agm}}} + [\text{HI}^-]]$

donde

$$(H^+)_T = [H^+]_T + [HI^-] \quad (3)$$

$$[H^+]_T = [H^+] + [\text{HSO}_4^-] + [\text{HF}] = 10^{-\text{pH}_{\text{agm}}} \quad (4)$$

$$\text{pH}_T = 4,2699 + 0,002578(35 - S_a) + \log \left[\frac{(R - 0,00131)}{(2,3148 - (0,1299)R)} \right] \quad (5)$$

$$\text{pH}_{\text{agm}} = \text{pH}_T - \log (1 - (0,001005 * S_a)) \quad (6)$$

donde

pH_T = pH en la escala total.

pH_{agm} = pH en la escala de agua de mar.

S_a = salinidad de la solución después de titular:

$$S_a = \frac{(S_m * V_m)}{(V_a + V_m)} \quad (7)$$

donde

S_m = salinidad de la muestra antes de añadirle el ácido

$$R_{(25)} = \frac{[(A_{616I} - A_{750I}) - (A_{616SI} - A_{750SI})]}{[(A_{444I} - A_{750I}) - (A_{444SI} - A_{750SI})]} \quad (8)$$

donde

R = cociente de absorbancias ($R = A_{616}/A_{444}$).

$A_{\lambda I}$ = absorbancia a longitudes de onda de 444, 616 y 750 nm con indicador.

$A_{\lambda SI}$ = absorbancia a longitudes de onda de 444, 616 y 750 nm sin indicador.

Referencias

- Breland, J. A.; Byrne, R. H. (1993). "Spectrophotometric procedures for determination of seawater alkalinity using bromocresol green". *Deep-Sea Research I*, 40 (3): 629-641.
- Yao, W.; Byrne, R.H. (1998). "Simplified seawater alkalinity analysis: use of linear array spectrometers". *Deep-Sea Research I*. 45: 1383-1392.

Método 8. Determinación de los Coeficientes de Absorción Espectral de las Partículas y del Fitoplancton

Laurencia Guzman y Ramón Varela

Introducción

El tamaño, naturaleza y abundancia de las partículas en suspensión en el mar influyen en el clima de la luz en el agua, lo cual afecta la actividad y distribución del plancton, e indirectamente las concentraciones de algunos de los elementos químicos que se encuentran en la capa fótica. En sentido inverso, las propiedades ópticas inherentes pueden revelar las características y cantidad de partículas en el mar. El procedimiento que aquí se describe determina el coeficiente de absorción espectral tanto para las partículas en general, como específico para el fitoplancton. La técnica, basada en Kishino *et al.* (1985), mide la absorción de la luz que pasa por un filtro húmedo que contiene partículas.

Fundamentos del Método

El método se fundamenta en el cambio que se observa en el espectro de absorción de luz de un filtro húmedo que retiene las partículas en suspensión de una muestra de agua de mar en referencia a un filtro blanco. Al filtro con la muestra se le mide el espectro de absorción antes y después de la extracción de los pigmentos con metanol caliente (60 °C). Esta técnica determina el coeficiente de absorción total de partículas, $a_p(\lambda)$, y el coeficiente de absorción de detritus (partículas sin pigmentos), $a_d(\lambda)$. La diferencia en la transmisión óptica entre ambos parámetros se relaciona con el coeficiente de absorción del fitoplancton $a_{ph}(\lambda)$. Los resultados se expresan en m^{-1} .

Interferencias

1. En las mediciones se producen variaciones debido a diferencias en las características de las partículas en el agua, al equipo empleado (espectrofotómetro o espectroradiómetro) y al tipo de filtro utilizado. Esta interferencia se corrige para cada caso en particular aplicando un factor de amplificación de la longitud del paso de luz, β (Kishino *et al.*, 1985; Mitchell y Kiefer, 1988; Bricaud y Stramski, 1990; Mitchell, *et al.* 2002).
2. Si la extracción de los pigmentos con el solvente es incompleta, el coeficiente del material detrítico se puede sobreestimar y afectar el coeficiente de absorción del fitoplancton. Es importante observar que no haya una señal de absorción del fitoplancton en las mediciones de $a_d(\lambda)$ hacia las longitudes de onda más largas (rojo).
3. La cantidad de material retenido por el filtro no debe generar una densidad óptica (DO) mayor de 0,25 y menor de 0,05 cuando se mide a 675 nm o menor a 0,4 a 440 nm (Mitchell *et al.*, 2002). Cuando la cantidad de material retenido en el filtro es muy baja, es difícil apreciar un cambio de color en la superficie del filtro. El volumen de agua que se filtra debe estar en función de la cantidad de partículas presentes en la muestra de manera de poder controlar la intensidad del color en el filtro.

Materiales

1. Filtros Whatman, GF/F, de 0,7 μm , 25 mm de diámetro.
2. Placas de Petri pequeñas (plásticas).
3. Jeringa de plástico de 60 mL.
4. Manguera de 10 cm de largo que se conecta a la punta de la jeringa.
5. Pipeta Pasteur de 5 mL con bulbo de goma.
6. Embudo para filtros de 25 mm de diámetro y capacidad de 200 mL.
7. Cilindro graduado de 50 mL.

Equipos

1. Unidad de filtración y bomba de vacío para la toma de muestras así como para el laboratorio.
2. *Equipo de medición.*
 - a. Espectrofotómetro con capacidad para barridos espectrales con un ancho de banda en el visible de 380 a 800 nm, y una resolución óptica del instrumento menor de 4 nm. Para poder medir la DO de los filtros en un espectrofotómetro se requiere de un accesorio especial (no disponible con todos los fabricantes) que ilumine por transmisión la totalidad del área del filtro y que mida la luz que pasa a través de él.
 - b. Otra opción es emplear un espectroradiómetro. Este tipo de instrumento mide las cantidades radiométricas en intervalos de longitud de onda estrechos en una región espectral dada. El equipo emplea una fibra óptica de ángulo de visión conocido que enfoca justo el área del filtro. El filtro es iluminado totalmente en forma uniforme con una lámpara incandescente de halógeno. En los análisis del proyecto CARIACO se emplea un Spectrascan PR-650 de Photo Research y se usa una caja oscura con una fuente de luz que sostiene e ilumina el filtro por transmisión y que sirve además de soporte fijo para el enfoque de la fibra óptica. Este tipo de equipo descompone la luz incidente en diferentes longitudes de onda en distintas direcciones angulares luego que esta pasa a través de la muestra. El elemento sensible es una serie de fotodiodos, que miden las diferentes longitudes de onda. El rango útil de estas mediciones es entre 420 y 750 nm, ya que las longitudes de onda más corta se registran a intensidades muy bajas, y la fibra óptica usada las absorbe fuertemente.
3. Baño de agua a 60°C con una estabilidad de $\pm 0,5$ °C.
4. Se puede medir la cantidad de clorofila presente en el extracto del metanol que lava el filtro, para lo cual se debe utilizar un espectrofotómetro con cubetas de 10-cm y seguir un procedimiento para análisis espectrofotométrico de pigmentos (Strickland y Parsons, 1972), o utilizar un fluorómetro con lo cual se puede medir la clorofila siguiendo el **Método 13** de este manual.

Reactivos

1. **Metanol** (CH_3OH).

Captación de Muestras

1. Captar las muestras de agua de la roseta en botellas de plástico oscuras de 2 L.
2. Filtrar el agua a través de filtros Whatman GF/F utilizando la bomba de vacío. Anotar el volumen filtrado. El volumen a filtrar depende de la cantidad de partículas en el agua lo cual es indicado por el grado de saturación del filtro. En aguas con biomasa moderada (de 0,5 a 1 mg m⁻³ de clorofila) como son las aguas cercanas a la costa, un volumen medio de 2 L es suficiente. En aguas con más partículas se debe reducir hasta 0,25 L. En aguas oceánicas se requiere más volumen hasta producir una coloración apreciable en el filtro.
3. Guardar cada filtro sin doblar en placas de Petri debidamente identificadas con la cara que retiene las partículas hacia arriba.
4. Cubrir las placas con papel de aluminio para evitar la exposición a la luz.
5. Congelar los filtros colocando las placas en posición horizontal hasta el momento de realizar el análisis.

Análisis de Muestras

Encender la fuente de luz 15 minutos antes de comenzar el análisis para que estabilice.

1. *Preparación de muestras*

- a. Descongelar los filtros con la muestra.
- b. Colocar papel absorbente, humedecido con agua destilada, por debajo de los filtros dentro de las placas de Petri para mantenerlos húmedos. Utilizar una espátula para levantar el filtro de manera de no tocar la cara superior del mismo, y mantener las placas tapadas con papel aluminio todo el tiempo.
- c. Preparar un filtro de referencia (blanco) de la misma manera que en el paso 2.

2. *Análisis*

- a. *Absorción de luz por las partículas totales (a_p):*
 - i. Medir el espectro de absorción de luz del blanco (DO).
 - ii. Medir el espectro de absorción de luz del filtro con la muestra (DO_{m(λ)}).
- b. *Absorción debida al material detrítico (a_d , extracción con metanol caliente).*
 - i. Colocar metanol en un frasco con la tapa semi-abierta ligeramente enroscada.
 - ii. Calentar el metanol en un baño de agua a una temperatura de 60°C. Realizar **este paso bajo campana de extracción de gases usando guantes y lentes de seguridad.**
 - iii. Colocar el filtro con muestra en un embudo de filtración.
 - iv. Con una pipeta Pasteur agregar metanol caliente al filtro en alícuotas de 5 mL.
 - v. Filtrar lentamente hasta usar unos 50 mL de metanol. La solución una vez que pasa por el filtro se recupera en un cilindro graduado.
 - vi. Anotar el volumen total filtrado en el cilindro. Este volumen representa el extracto que se puede emplear para determinar la concentración de clorofila.
 - vii. Medir el espectro de absorción de luz del blanco.

- viii. Medir el espectro de absorción de luz del filtro con la muestra después de ser lavado con el metanol ($OD_{mL(\lambda)}$).

Para determinar la cantidad de clorofila *a* ó calcular los índices de pigmentos por espectrofotometría y/ó fluorometría (Strickland y Parsons, 1972), se debe mezclar primero el extracto de pigmentos en metanol con una jeringa a la cual se le coloca una pequeña manguera en un extremo y con la misma se trasvasa el extracto a cualquier otro recipiente adecuado para realizar las mediciones.

Cálculo y Expresión de Resultados

Los coeficientes de absorción, en la banda del visible de 380 a 750 nm con una resolución óptica menor de 4 nm, se calculan mediante las siguientes expresiones:

1. El coeficiente de absorción de partículas totales se calcula con la siguiente ecuación:

$$a_p(\lambda) = A \left[\frac{(2,3 * DO_{m(\lambda)})}{(\beta * V)} \right] \quad (1)$$

donde

$a_p(\lambda)$ = coeficiente espectral de absorción por parte de las partículas (m^{-1}).

A = área utilizada del filtro = $3.63 \times 10^{-4} m^2$ para filtros de 25 mm.

$DO_{m(\lambda)}$ = densidad óptica corregida = $DO_{m(\lambda)} - DO_{750}$

DO_{750} = Ajuste = promedio de DO entre 752 nm y 780 nm, en donde la absorción por fitoplancton se asume como cero.

β = $1.63 [(DO)^{-0.22}]$ (factor de amplificación del filtro; Mitchell y Kiefer, 1988; Bricaud y Stramski, 1990)

V = volumen en m^3 de agua filtrada.

2. El coeficiente de absorción de detritus se calcula con la siguiente ecuación:

$$a_d(\lambda) = A \left[\frac{(2,3 * DO_{mL(\lambda)})}{(\beta * V)} \right] \quad (2)$$

donde

$a_d(\lambda)$ = coeficiente espectral de absorción detrítica debida a los restos vegetales y otras partículas sin clorofila (m^{-1}).

$(OD_{mL(\lambda)})$ = densidad óptica corregida = $DO_{mL(\lambda)} - DO_{750}$

Se realizan los mismos cálculos que para $a_p(\lambda)$, pero utilizando las absorbancias del filtro después de la extracción con el metanol caliente.

3. El coeficiente de absorción del fitoplancton se calcula con la siguiente ecuación:

$$a_{ph}(\lambda) = a_p(\lambda) - a_d(\lambda) \quad (3)$$

donde

$a_{ph}(\lambda)$ = coeficiente espectral de absorción de luz debida a los pigmentos del fitoplancton (m^{-1}).

Referencias

- Bricaud, A.; Stramski, D. (1990). "Spectral absorption coefficients of living phytoplankton and nonalgal biogenous matter: A comparison between the Peru upwelling area and the Sargasso Sea." *Limnology and Oceanography* 35 (3): 562-582.
- Kishino, M.; Takahashi, M., Okami, N., Ichimura, S. (1985). "Estimation of the spectral absorption coefficients of phytoplankton in the sea". *Bulletin of Marine Science*. 37 (2): 634-642.
- Mitchell, G.; Kiefer, D.A. (1988). "Chlorophyll *a* specific absorption and fluorescence excitation spectra for light-limited phytoplankton". *Deep-Sea Research*. 35 (5): 639-663.
- Mitchell, G.; Kahru, M.; Wieland, J.; Stramska, M. (2002) "Determination of spectral absorption coefficients of particles, dissolved material and phytoplankton for discrete water samples" En: Mueller, J.L.; Fargion, G. F.; McClain, C. R. (Eds). *Ocean Optics Protocols For Satellite Ocean Color Sensor Validation, Revision 4, Volume IV: Inherent Optical Properties: Instruments, Characterization, Field Measurements and Data Analysis Protocols*. National Aeronautical and Space Administration NASA/TM –2003: Chapter 4: 39-64.
- Strickland, J. D. H.; Parsons, T. R. (1972). "A practical handbook of seawater analysis". *Fisheries Research Board of Canada*. Bulletin 167, 2nd edition, 310 pgs.

Método 9. Determinación de Materia Orgánica Disuelta Coloreada

Laurencia Guzman y Ramón Varela

Introducción

La materia orgánica disuelta coloreada (MODC ó CDOM por sus siglas en ingles) es producto de la descomposición de compuestos orgánicos, principalmente de origen vegetal, aportados por los ríos y la degradación del fitoplancton en el mar. La MODC se define como el material que pasa por un filtro de 0,2 μm y se cuantifica en unidades de absorción para longitudes de onda específicas. El espectro de absorción de la MODC disminuye exponencialmente hacia longitudes de onda mayores, con su máximo de absorción en el ultravioleta. Este procedimiento describe el método para determinar MODC, utilizando un método espectrofotométrico con el cual se calcula el coeficiente de absorción del material disuelto (a_g), basándose en la definición de Bricaud *et al.* (1981), Nelson y Siegel (2002) y Nelson *et al.* (2007).

Fundamentos del Método

La absorbancia de la MODC se mide en la región del ultravioleta y el azul empleando un espectrofotómetro. El coeficiente de absorción del material disuelto se calcula a partir de estos valores para la(s) longitud(es) de onda deseada(s).

Interferencias

1. Usar agua recién destilada para el blanco y almacenar al resguardo de la luz bajo refrigeración para prevenir alguna alteración. Un blanco contaminado puede afectar el coeficiente de absorción de la MODC.
2. La línea base en las mediciones espectrofotométricas debe ser constante. Una línea base fluctuante puede afectar el coeficiente de absorción de la MODC.
3. Filtrar lentamente para evitar la rotura del filtro (y el paso de partículas a través del mismo) ó que las células se rompan (lo que libera los componentes intracelulares).
4. La exposición de las muestras a la luz por periodos prolongados puede resultar en una pérdida de color lo cual afecta el coeficiente de absorción de la MODC.

Materiales

Emplear guantes de polietileno en todo momento para manipular los materiales y las muestras.

1. Filtros de jeringa de nylon, de 25 mm de diámetro y 0,2 μm de tamaño de poro.
2. Jeringas plásticas de 60 mL sin émbolo.
3. Jeringa de vidrio de 60 mL, con aguja de acero inoxidable de 10,2 cm de largo.
4. Celdas de cuarzo, 10-cm paso de luz, con tapas de Teflon[®].
5. Botellas de vidrio ámbar de 60 mL con tapa de Teflon[®].

Reactivos

1. **Acido clorhídrico (HCl)**, concentración de 37% y una densidad de $1,19 \text{ g mL}^{-1}$, añadir 227 mL de HCl en 773 mL de agua destilada cuidadosamente y lentamente mientras se mezcla.
2. **Metanol (CH₃OH)**, grado reactivo ó mejor.

Equipo

1. Espectrofotómetro para mediciones espectrales con un ancho de banda de 200 – 850 nm.

Captación de Muestras

1. **Pretratamiento del material de recolección.**
 - a. Sumergir las botellas ámbar, sus tapas y las jeringas en una solución de HCl al 10% por una noche a temperatura ambiente y luego enjuagar con agua destilada.
2. **Captación de muestra.**
 - a. Captar la muestra con una jeringa plástica utilizando guantes de polietileno. Antes de captar la muestra, retirar el émbolo y lavar la jeringa tres veces con la muestra.
 - b. Llenar la jeringa y conectar el filtro a la punta de la jeringa. Filtrar la muestra directamente dentro de la botella ámbar. Enjuagar la botella ámbar 3 veces con la muestra filtrada. Dejar un espacio de aire en la botella de aproximadamente 1 mL (1% del volumen total de la botella) para permitir la expansión del agua al congelar.
 - c. Congelar la muestra a $-20 \text{ }^{\circ}\text{C}$.

Análisis de Muestras

1. La adecuada preservación de la muestra permite que la misma permanezca sin alterar varios meses, siempre y cuando se mantenga congelada resguardada de la luz.
2. Descongelar las muestras y permitir que alcancen temperatura ambiente.
3. Extraer la muestra de la botella utilizando una jeringa de vidrio con aguja metálica.
4. Retirar la aguja y colocar otro filtro de jeringa de $0,2 \text{ }\mu\text{m}$. Filtrar directamente en la celda enjuagando tres veces con la muestra. Llenar tres cuartos de la celda sin que queden burbujas. Limpiar y secar el exterior de la celda completamente.
5. Preparar una celda con agua recién destilada (blanco) a temperatura ambiente.
6. Realizar la medición espectral de la muestra (absorbancia, $A_{(\lambda)}$) ajustando el espectrofotómetro con el blanco. Al finalizar, las muestras no pueden congelarse nuevamente, pero si pueden permanecer refrigeradas en sus botellas ámbar por no más de 3-4 días.
7. Si es necesario corregir fluctuaciones de la línea base, sustraer de cada longitud de onda el valor de absorbancia a 700 nm.

Cálculo y Expresión de Resultados

El cálculo del coeficiente de absorción del material disuelto (a_g) se realiza mediante la siguiente expresión (Bricaud *et al.*, 1981):

$$a_g(\lambda) = 2.303 A_{(\lambda)}/L \quad (1)$$

donde

$A_{(\lambda)}$ = absorbancia a una determinada longitud de onda (m^{-1}).

L = longitud de la celda (0.1 m)

Referencias

- Bricaud, A.; Morel, A.; Prieur, L. (1981). "Absorption by dissolved organic matter of the sea (yellow substance) in the UV and visible domains". *Limnology and Oceanography*. 26 (1): 43-53.
- Nelson, N.B.; Siegel, D. A. (2002). "Chromophoric DOM in the open ocean". En: Hansell, D.A.; Carlson, C.A. (Eds.), *Biogeochemistry of Marine Dissolved Organic Matter*. Academic Press, San Diego, CA, pp. 509–546.
- Nelson, N.B.; Siegel, D.A.; Carlson, C.A.; Swan, C.; Smethie Jr., W.M.; Khatiwala, S. (2007). "Hydrography of chromophoric dissolved organic matter in the North Atlantic". *Deep-Sea Research, Part I*, 54: 710-731.

Método 10. Determinación de Carbono Orgánico y Nitrógeno Total y Disuelto

Laura Lorenzoni

Introducción

Este procedimiento describe el método para determinar carbono orgánico total (COT), carbono orgánico disuelto (COD), nitrógeno total (NT) y disuelto (NTD) en agua de mar. El COT es el contenido total de carbono en agua de mar encontrado en los compuestos orgánicos no volátiles. El COD es la fracción del COT que pasa a través de un filtro con diámetro de poro de $0,7 \mu\text{m}$ y a la cual se le elimina el carbono inorgánico por acidificación y aireación. NT es la suma de todas las formas de nitrógeno (inorgánico y orgánico), y NTD es la fracción disuelta del nitrógeno total en agua de mar, definida de la misma manera que el COD. Esta determinación utiliza un método de combustión catalítica. Los resultados se expresan en $\mu\text{mol L}^{-1}$ de carbono (nitrógeno). El rango de concentración detectable por este método es entre 0 y $400 \mu\text{mol L}^{-1}$ de carbono orgánico disuelto y $0 - 50 \mu\text{mol L}^{-1}$ de nitrógeno total disuelto. El método que a continuación se describe es tomado de Dickson *et al.* (2007).

Fundamentos del Método

El método para COT y COD se basa en la oxidación total de los compuestos orgánicos no volátiles a CO_2 a través de una combustión catalítica a $680 \text{ }^\circ\text{C}$. La muestra de agua de mar, filtrada para COD y sin filtrar para COT, se acidifica y airea con oxígeno antes de la combustión. La muestra se introduce en una columna de combustión empacada con pequeñas esferas de alúmina cubiertas con platino las cuales se mantienen a $680 \text{ }^\circ\text{C}$. La cantidad de CO_2 producido durante este proceso se mide mediante un Detector de Infrarrojo No-Dispersivo (DIND). Para el análisis de NTD, la muestra se calcina para convertir los compuestos no volátiles de nitrógeno en NO, el cual forma quimioluminiscencia cuando se mezcla con ozono, lo cual se mide con un fotomultiplicador.

Interferencias

1. El carbono inorgánico presente en la muestra produce una interferencia positiva la cual se elimina al acidificar y airear con oxígeno antes de la combustión.
2. La contaminación de la muestra puede ocurrir fácilmente a través del aire, el contacto con los dedos ó al tocar la espita de la botella Niskin sin usar guantes. Es necesario tener mucho cuidado durante la captación, manejo, filtración y almacenamiento de la muestra de manera de prevenir la contaminación. Algunas precauciones son:
 - a. Realizar la captación de muestra usando guantes de polietileno tanto cuando se extraen las muestras previas a la captación de COT y COD (ej.: gases) como durante la captación de las muestras de COT y COD.
 - b. Durante la captación, usar únicamente mangueras de silicona ya que cualquier otro tipo, como Tygon[®], representan una fuente de contaminación.
 - c. Evitar el contacto del portafiltro ó de la espita de la botella Niskin con la botella de polietileno que se emplea en la captación.
 - d. Evitar en todo momento el contacto con grasa.

- e. Almacenar la muestra en congeladores donde no se guarden ni se hayan guardado previamente solventes ó material orgánico.
3. Debido a la manipulación, el proceso de filtración puede ser una fuente de contaminación. En muestras con un contenido bajo de carbono orgánico en partículas ($< 1 \mu\text{mol L}^{-1}$), es preferible no filtrar las muestras; sin embargo, la filtración es necesaria en muestras con un contenido elevado de partículas (ej.: aguas altamente productivas). En la Fosa de Cariaco, las muestras se filtran hasta los 250 m (ver Tabla 1.3, **Método 1** para las profundidades de captación) debido al elevado contenido de partículas que se encuentran en las aguas superficiales, así como a nivel de la interfase donde se acumulan las bacterias.

Materiales

1. Filtros Whatman GF/F, de 47 mm, calcinados durante cuatro horas a 450°C y guardados en cápsulas de vidrio cerradas.
2. Mangueras de silicona y unidades de filtración en línea de policarbonato para filtros de 47 mm lavados con HCl al 10% y enjuagados tres veces con agua destilada.
3. Botellas de polietileno de alta densidad (HDPE), 60 mL de capacidad, las cuales se sumergen en HCl al 10% por cuatro horas y se enjuagan tres veces con agua destilada. Secar boca abajo sobre una superficie limpia.

Reactivos

1. **Gas oxígeno de alta pureza, 99,995 % de pureza.**
2. **Catalizador de la columna de combustión.** Columna empacada con esferas de alúmina de 2 mm recubiertas con platino (Shimadzu P/N 017-42801-01) mantenidas a 680°C .
3. **Gasa de platino.** Gasa de alambre de platino puro (malla 52 tejida con alambres de 0,1 mm de diámetro), moldeada en cubos ($\sim 0,5$ cm de lado). De tres a cinco cubos se colocan en la parte superior de la columna de combustión.
4. **Material de referencia por consenso (MRC).** Agua profunda del Mar de los Sargazos/Estrecho de Florida ($44\text{-}46 \mu\text{M COD}$), disponible en ampollas de 10 mL del Departamento de Química Marina y Atmosférica de la Universidad de Miami, RSMAS/MAC (<http://www.rsmas.miami.edu/groups/biogeochem/CRM>).
5. **Agua Baja en Carbono (ABC).** Agua con una concentración de carbono entre $1\text{-}2 \mu\text{mol C L}^{-1}$, la cual se obtiene también del RSMAS/MAC.
6. **Ácido clorhídrico (HCl al 10%).**
7. **Ácido clorhídrico.** Grado analítico de metal traza.
8. **Ftalato ácido de potasio ($\text{C}_8\text{H}_5\text{O}_4\text{K}$).** Preparar de acuerdo a la concentración de carbono presente en la muestra.
9. **Nitrato de potasio (KNO_3).**
10. **Agua Milli-Q®.**

Equipo

1. Analizador de carbono orgánico Shimadzu TOC-V_{CSH} con automuestreador ASI-V y detector de nitrógeno total TNM-1 (ó equivalente). Tanto el detector de carbono como el de nitrógeno funcionan en forma independiente. En caso de utilizar otro tipo de instrumento producido por otro fabricante, se debe evaluar su aplicación en muestras de agua de mar.

Captación de Muestras

1. Las muestras se toman después de los gases y el pH. Primero se extrae la muestra de COT (NT), seguida por la de COD (NTD).
2. Para COT, la muestra se colecta directamente de la espita de la botella Niskin. Lavar la botella de HDPE tres veces con agua de la muestra y llenar hasta $\frac{3}{4}$ el volumen de la botella, congelar en posición vertical.
3. Para extraer la muestra de COD se conecta una unidad de filtración en línea a la espita de la botella Niskin utilizando una manguera flexible de silicona y se filtra la muestra a través de un filtro de fibra de vidrio calcinado colocado dentro de la unidad. Permitir que el agua fluya por dos minutos a través de la unidad de filtración y el filtro. Lavar la botella de HDPE tres veces con la muestra y llenar hasta $\frac{3}{4}$ el volumen de la botella. Congelar en posición vertical.
4. Entre cada lance, desarmar las unidades de filtración y sumergir en HCl al 10 %. Lavar varias veces con agua destilada antes de volver a armar para la siguiente filtración.

Análisis de Muestras

1. *Pre-tratamiento de la muestra*

- a. Permitir que las muestras alcancen temperatura ambiente.
- b. Reducir el pH a < 2 acidificando la muestra con HCl concentrado grado metal traza en un volumen aproximado a 0,1 % del volumen total de muestra.

2. *Análisis*

- a. Las condiciones del analizador para carbono orgánico son las siguientes:

Temperatura de combustión	680°C
Gas transportador	Oxígeno de alta pureza
Velocidad de flujo del gas	150 mL min ⁻¹
Generador de ozono, gas cero	Aire desde el Generador Whatman de gas
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	0,1
CV máximo	2%
Volumen de inyección	100 µL

- b. El sistema se calibra para COT (COD) usando una solución de ftalato ácido de potasio (para NT y NTD se utiliza nitrato de potasio). Ambas soluciones se preparan en agua Milli-Q®.
- c. La operación del equipo se verifica antes del análisis, utilizando material de referencia (MRC). El agua baja en carbono (ABC) también se utiliza para verificar el funcionamiento del aparato.
- d. Colocar las muestras en un automuestreador para su análisis. La corrida del análisis comienza con un blanco de agua Milli-Q® y un MRC, seguido de seis muestras, otro blanco de agua Milli-Q® y un MRC. La secuencia se repite hasta analizar todas las muestras. El análisis termina con el blanco de agua Milli-Q®, un MRC y un blanco de agua Milli-Q® no acidificado. Este último blanco permite verificar si el ácido clorhídrico utilizado para acidificar las muestras presenta alguna evidencia de contaminación. Los blancos de agua Milli-Q® y el MRC se usan para evaluar el desempeño del instrumento durante el análisis. Si se detecta un problema, analizar las muestras nuevamente.

Cálculos y Expresión de Resultados

1. **Calculo de COT ó COD.** Calibrar el equipo Shimadzu TOC-V_{CSH} para carbono usando un análisis de 4 a 5 inyecciones de una solución estándar de ftalato ácido de potasio preparada con agua Milli-Q®. El instrumento determina la concentración en partes por millón (ppm). La siguiente formula se emplea para calcular la concentración en $\mu\text{mol L}^{-1}$ de carbono corregida con el blanco del instrumento:

$$\text{COT (COD)} = [(\text{Muestra}_{(\text{ppm})} - \text{ABC}_{(\text{ppm})}) \times 83,33333] + \text{Valor ABC } (\mu\text{M}) \quad (1)$$

donde

Muestra = concentración determinada por el analizador para la muestra.

ABC = concentración determinada por el analizador para el agua baja en carbono.

83,33333 = factor de conversión de ppm a $\mu\text{mol L}^{-1}$.

Cuando se subtrae de la muestra la concentración de carbono del ABC (ppm) al comienzo de la formula se eliminan tanto el blanco instrumental como el contenido de carbono del ABC; por lo tanto, el contenido de carbono del ABC se añade de nuevo (término al final de la ecuación) para calcular la concentración correcta de la muestra.

2. **Calculo de NT y NTD.** El instrumento se calibra usando un método similar al del carbono. La solución estándar que se emplea es nitrato de potasio preparada con agua Milli-Q®. El instrumento se calibra en ppm y la conversión a $\mu\text{mol L}^{-1}$ es la siguiente:

$$\text{NTD} = \text{Muestra}_{(\text{ppm})} \times 71,43 \quad (2)$$

donde

Muestra = concentración de nitrógeno determinada por el analizador para la muestra.

71,43 = factor de conversión de ppm a $\mu\text{mol L}^{-1}$.

No existe un blanco instrumental para el sistema de nitrógeno. El nitrógeno orgánico disuelto (NOD) se calcula al restar el nitrógeno inorgánico (NO_2^- , NO_3^- , NH_4^+) al NTD determinado por el analizador.

Referencias

Dickson, A.G.; Sabine, C.L.; Christian, J.R. (Editores). (2007). Guide to Best Practices for Ocean Measurements. PICES Special Publication 3, 191 pgs.

Método 11. Determinación de Carbono y Nitrógeno en Partículas

Eric Tappa

Introducción

Este procedimiento describe el método para determinar carbono y nitrógeno en partículas (CP y NP) en agua de mar. La materia orgánica presente en el agua de mar se puede encontrar tanto en forma disuelta como en partículas. Por lo tanto, el CP (NP) es la cantidad total de carbono (nitrógeno) en agua de mar que no pasa a través de un filtro de tamaño de poro conocido ($0,7 \mu\text{m}$). El método cuantifica la cantidad de carbono (nitrógeno) total sobre el filtro utilizando un analizador elemental el cual utiliza combustión seca en un ambiente puro de oxígeno/helio durante el cual el carbono (nitrógeno) se reduce a CO_2 (gas N_2). En las muestras de la Fosa de Cariaco, la fracción inorgánica en partículas no es significativa; por lo tanto, se asume que el material retenido por el filtro está constituido mayoritariamente por materia orgánica. Los resultados se expresan en $\mu\text{g L}^{-1}$ de carbono (nitrógeno). El rango de concentración del método es entre 5 y $500 \mu\text{g L}^{-1}$ de carbono y $0,5 - 100 \mu\text{g L}^{-1}$ de nitrógeno. El método que a continuación se describe está tomado de Sharp (1974).

Fundamentos del Método

El método se basa en la combustión seca ($960 \text{ }^\circ\text{C}$) y cuantitativa de las sustancias orgánicas e inorgánicas presentes en la muestra en un ambiente puro de helio al cual se le agrega oxígeno como catalizador. Los gases resultantes de la combustión son arrastrados por gas helio hacia una columna de cromatografía donde se separan y se cuantifican por medio de un detector de conductividad termal.

Interferencias

1. Si el objetivo es establecer la concentración del carbono orgánico en partículas, la fracción de carbono inorgánico presente en la muestra se debe eliminar (carbonatos y bicarbonatos). El proceso de remoción se realiza exponiendo los filtros que contienen la muestra a vapores de ácido clorhídrico concentrado (Schubert y Nielsen, 2000) en un desecador durante 24 horas. Colocar un recipiente abierto con el ácido en el compartimiento inferior del desecador. Luego, secar los filtros a $65 \text{ }^\circ\text{C}$ por 24 horas, doblar y colocar en discos de estaño, y almacenar en un desecador hasta el momento del análisis.
2. La presencia de material orgánico ó aceites sobre el filtro, discos y placas de Petri pueden contaminar la muestra. Calcinar los filtros que se van a usar y lavar con metanol todos los materiales que se utilizan para almacenar y manipular el filtro. Usar guantes de polietileno en todo momento mientras se manipulan los filtros, los discos de estaño y las placas de Petri.

Materiales

1. Filtros de fibra de vidrio, Whatman GF/F, 25 mm de diámetro. Calcinar los filtros durante cuatro horas a $450 \text{ }^\circ\text{C}$, sumergir en HCl al 10 % por $4 \frac{1}{2}$ horas y posteriormente en agua

- destilada por dos horas. Colocar los filtros en una estufa a 70 °C por una noche y guardar en placas de Petri.
2. Placas de Petri pequeñas de plástico, de poliestireno cristal. Sumergir en metanol y colocar en un desecador por una hora. Poner un trozo de papel de pesar en cada placa.
 3. Botellas plásticas oscuras de 2 L.
 4. Pinzas calcinadas y lavadas con metanol.
 5. Discos de estaño para los filtros (30 mm de diámetro) y cápsulas de estaño para los estándares (8 x 5 mm). Lavar con metanol y colocar en una estufa a 60 °C por una hora.
 6. Desecador.
 7. Tubos de Teflón®.
 8. Embudos para filtros de 25 mm y de 200 mL de capacidad.

Equipos

1. Analizador Elemental Perkin Elmer 2400 CHN, el instrumento PE2400 tiene una precisión para carbono de 0,2% y para nitrógeno de 0,1%.
2. Microbalanza con una precisión de 0,001 g.
3. Estufa (103 – 105 °C).
4. Unidad de filtración y bomba de vacío para la toma de muestras.

Reactivos

1. **Gas helio.** Ultra alta pureza.
2. **Gas oxígeno.** Ultra alta pureza.
3. **Cistina.** Calidad reactivo (29,99%C y 11,66%N)

Captación de Muestras

1. Recolectar las muestras en botellas plásticas oscuras de 2 L, lavando tres veces las mismas con el agua de la botella Niskin antes de llenar.
2. Filtrar a través de filtros Whatman GF/F calcinados. Anotar el volumen filtrado. El volumen que se necesita filtrar depende de la cantidad de partículas en el agua lo cual se indica por el grado de saturación del filtro. En aguas costeras, un volumen medio de 2 L es suficiente. Si las aguas presentan una concentración de partículas mayor, reducir el volumen hasta no más de 0,25 L. En aguas oceánicas se requiere un mayor volumen (~ 4 L).
3. Guardar los filtros sin doblar en placas de Petri previamente lavadas con metanol, rotular y congelar. Guardar tres filtros sin usar como blancos por cada lance donde se recolecten muestras para CP (NP).

Análisis de Muestra

1. **Pretratamiento de las muestras**

- a. Colocar cada placa de Petri destapada con su filtro en una estufa a 60 °C por 12 horas para descongelar y secar el filtro.
- b. Colocar el filtro sobre un disco de estaño con la muestra hacia abajo, enrollar y doblar los extremos utilizando dos pinzas calcinadas.

2. *Análisis*

- a. Colocar el filtro y el disco de estaño en un tubo de Teflón® y comprimir con una varilla de Teflón®.
- b. Las muestras se introducen a través de un automuestreador en un Analizador Elemental PE2400 siguiendo las indicaciones del fabricante.

Análisis de las Soluciones Estándares y Blancos

1. Los blancos (filtros sin usar) se analizan para determinar los niveles de línea base de C y N. Colocar los blancos en discos de estaño, enrollar y doblar igual que las muestras. Realizar el análisis de los mismos según el procedimiento que se especifica en la sección **Análisis de Muestra**.
2. El PE 2400 se calibra usando cristales de Cistina como estándar. Pesar la cistina (entre 0,5 – 2 mg) en una cápsula de estaño previamente lavada con metanol. Doblar la cápsula y analizar según el procedimiento que se especifica en la sección **Análisis de Muestra**. Analizar tres estándares de cistina por cada lance.
3. En la estación CARIACO se efectúan dos lances para coleccionar las muestras de la columna de agua, donde se captan 19 muestras para el análisis de CP (NP); por lo tanto, se analizan seis estándares y seis blancos lo que suma 25 análisis en total durante la corrida del analizador. Los dos lances conforman el perfil completo de la columna de agua.

Cálculo y Expresión de Resultados

Los factores de calibración para carbono (Kc) y nitrógeno (Kn) se determinan (en términos de µg de C y N) usando la siguiente fórmula:

$$K \text{ Factor}_{(C \text{ ó } N)} = \frac{(A - B)}{(C * D)} \quad (1)$$

donde

A = conteos muestra.

B = conteos blanco.

C = peso de la muestra.

D = peso (%) teórico del estándar.

Con cada uno de los factores K se determinan los valores de carbono ó nitrógeno en la muestra usando la siguiente ecuación:

$$\mu\text{g L}^{-1} (\text{C ó N}) = \frac{(A - B)}{(\text{FactorK}_{(\text{C ó N})} * V)} \quad (2)$$

donde

V = volumen del agua filtrada, en litros.

Referencias

Schubert, C.J.; Nielsen, B. (2000). "Effects of decarbonation treatments on d^{13}C values in marine sediments". *Marine Chemistry*. 72: 55–59.

Sharp, J.H. (1974). "Improved analysis for "particulate" organic carbon and nitrogen from seawater". *Limnology and Oceanography*. 19:984-989.

Método 12. Determinación de Nutrientes Utilizando Análisis de Flujo Continuo (AFC) *Kent Fanning, Robert Masserini y Laura Lorenzoni*

Introducción

El siguiente método describe la metodología de Louis I. Gordon, Joe C. Jennings, Jr., Andrew A. Ross y James M. Krest – “A Suggested Protocol for Continuous Flow Automated Analysis of Seawater Nutrients” (del WOCE Hydrographic Program y el Joint Global Ocean Fluxes Study, Gordon *et al.*, 2000) revisado por Andrew Ross en agosto del 2000 y modificado subsecuentemente por Kent Fanning y Robert Masserini del Laboratorio de Análisis de Nutrientes de la Universidad del Sur de la Florida. Los métodos y los diagramas de flujo de las configuraciones que se presentan son adecuados para evaluar nutrientes tales como fosfato, amonio, nitrato, nitrito y ácido silícico.

Fundamentos del Método

El análisis de flujo continuo (AFC) es un método automatizado de análisis de nutrientes en el cual se utiliza un Technicon Autoanalyzer II o sistema equivalente, equipado con una bomba peristáltica de varios canales. El AFC disminuye el error técnico, al tratar las muestras y los estándares de manera similar mejorando la precisión en la adición de los reactivos. La introducción de burbujas de aire en el flujo (flujo segmentado) reduce la interacción de muestras adyacentes y mejora la incorporación de los reactivos con el flujo de la muestra. El flujo segmentado pasa a través de un sistema de serpentinas de vidrio donde la mezcla ocurre. La mezcla reactivo-muestra reacciona químicamente para producir un compuesto coloreado cuya absorción de luz es aproximadamente proporcional a la concentración del nutriente en la muestra. Dicha absorción se mide a través de un colorímetro situado al final del sistema de flujo continuo.

Advertencias Analíticas

1. Fluctuaciones en la temperatura del laboratorio pueden causar interferencias en la cinética de la reacción que genera el color de la muestra. Este problema se observa en los análisis de ácido silícico. Una temperatura demasiado elevada conduce a la degasificación del fluido, causando interferencia en el flujo segmentado.
2. No es recomendable mantener los nutrientes congelados por un periodo prolongado, dado que se degradan. Muestras de ácido silícico no se deben congelar.
3. Filtrar las muestras antes de congelar debido a que las partículas en suspensión pueden alterar la medición.
4. No es aconsejable el uso de agua desionizada para línea base del sistema o como agua de ‘lavado’ entre muestras y estándares. Esta agua es solo recomendable para establecer el cero analítico. El agua utilizada en el sistema debe tener la misma salinidad de la muestra para no alterar el índice de refracción ni introducir ruido dentro del sistema de análisis.
5. Mantener constante la presión hidráulica a lo largo del sistema de flujo para evitar señales falsas.
6. Al preparar estándares analíticos en recipientes de plástico (polipropileno, etc.), calibrar los frascos gravimétricamente a una temperatura constante, ya que la temperatura afecta su volumen interno.

7. Excluir las burbujas de la columna de Cadmio-Cobre (columna Cd-Cu).

Materiales de Campo

1. Filtros de membrana Nucleopore Track-Etch, 47 mm, o equivalente.
2. Unidad de filtración y bomba de vacío. Utilizar portafiltros de policarbonato, remojar en HCl al 5% por 1-2 horas y enjuagar con agua destilada.
3. Botellas de polietileno (250 mL) para captación y de HDPE (polietileno de alta densidad, 30 mL) para almacenar la muestra. Ambos tipos de botella se remojan en HCl al 10% por 12 horas y se enjuagan varias veces con agua destilada.

Materiales de Laboratorio

1. Frascos de vidrio calibrados graviméricamente (calidad NIST Clase A o equivalente).
2. Pipetas (Eppendorf Maxipettor, Lab Industries Standard REPIPET u otra de precisión equivalente de 0.1%).

Equipo

1. Technicon Autoanalyzer II (abreviado AA-II) o Astoria-Pacific International analyzer (antiguamente Alpkem) RFA-300 o RFA-2.
2. Bomba peristáltica.
3. Paquete analítico, el cual esta constituido por los accesorios de inyección, serpentinas de mezcla helicoidales y baños de calefacción.
4. Estructuración del sistema. Seguir las indicaciones de Gordon *et al.* (2000) (Figura 12.1).

Captación de Muestras

1. El interior de las botellas Niskin y las válvulas deben estar libre de cualquier residuo inorgánico u orgánico, así como de cualquier signo de corrosión. Reemplazar los componentes oxidados y limpiar el interior de las botellas con HCl 8 M en caso de que se observen manchas de óxidos.
2. Captar la muestra en una botella de polietileno de 250 mL. Enjuagar la botella tres veces con la muestra y llenar hasta $\frac{3}{4}$ de su volumen teniendo cuidado de no tocar con los dedos la tapa o la abertura de la botella ya que las huellas dactilares contaminan con fosfatos la muestra.
3. Filtrar la muestra a través de un filtro nucleopore directamente en una botella HDPE lavada previamente tres veces con agua filtrada. Cambiar el filtro cada cuatro muestras.
4. Llenar hasta $\frac{3}{4}$ el volumen de la botella, secar la tapa con una servilleta que no libere fibras y tapar firmemente. Congelar inmediatamente a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ en posición vertical en una gradilla para no permitir que la botella se voltee. Durante el proceso de congelación se produce una salmuera la cual se pierde si la botella no se tapa adecuadamente lo que puede causar errores realmente importantes.
5. Antes del análisis, descongelar las muestras empleando un baño de agua por un periodo de 15 minutos. Mezclar antes de abrir la tapa para garantizar una muestra homogénea.

6. Las muestras para silicatos se filtran pero no se congelan. Almacenar a 4 °C en posición vertical en una gradilla para evitar que se volteen.

Preparación de Agua Desionizada, Agua de Mar Baja en Nutrientes y Soluciones Estándars

Agua desionizada (ADI) y Agua de Mar Baja en Nutrientes (AMBN)

Seguir las indicaciones de Gordon *et al.* (2000) para el ADI y el AMBN que se usan en la preparación de reactivos, soluciones estandards y para el cero analítico.

Soluciones Estándar

Los cálculos de concentraciones molares proporcionadas en este texto provienen de las tablas compiladas por Weast *et al.* (1985, pp. D-232 y D-262). Anotar la fecha y hora de la preparación de los reactivos así como cuando se comienzan a utilizar.

Las soluciones estándar utilizadas durante el análisis son de tres tipos: A, B y C.

- **Estándar A.** Solución patrón a partir de la cual se preparan los estándares B y C; por lo tanto, es fundamental utilizar reactivos de calidad analítica.
- **Estándar B.** Solución que contiene alícuotas del estándar A.
- **Estándar C.** Solución de trabajo que se utiliza directamente en el AFC para calibración (preparada con AMBN y alícuotas del estándar B). Se preparan tres estándares C con concentraciones diferentes.

Preparar dos estándares A y medir ambos en el AA-II. El pico de absorbancia de ambos estándares debe ser idéntico; de lo contrario preparar un tercer estándar A, y así sucesivamente hasta que dos estándares coincidan.

Moler cuidadosamente en un mortero los reactivos en forma de cristal. Secar el polvo fino resultante en una estufa a 105°C por 48 horas y colocar en un desecador bajo vacío con BaO ó MgSO₄ por otras 48 horas. Permitir que los reactivos alcancen temperatura ambiente antes de pesar.

- a. **Estándar A para fosfato y nitrato (2.500 μM HPO₄²⁻ y 37.500 μM NO₃⁻).** Pesar 0,3402 g de fosfato diácido de potasio anhidro (KH₂PO₄, Fisher Scientific no. P382-500) y 3,7912 g de nitrato de potasio (KNO₃, Fisher Scientific no. P383-500). Transferir a dos matraces volumétrico de 1000 mL (uno para cada reactivo). Disolver en ADI y diluir hasta el aforo.
- b. **Estándar A para nitrito (2.000 μM NO₂⁻).** Pesar 0,1380 g de nitrito de sodio (NaNO₂, Fisher Scientific no. S347-500) con un grado de pureza 97-98% y transferir a un matraz volumétrico de 1000 mL. Disolver en ADI y diluir hasta el aforo.
- c. **Estándar A para amonio (30.000 μM NH₄⁺).** Pesar 1,6037 g de cloruro de amonio (NH₄Cl, 99% pureza, Sigma Aldrich no. 32,637-2) y transferir a un matraz volumétrico de 1000 mL. Disolver en ADI y diluir hasta el aforo.

- d. **Estándar A para ácido silícico ($20.000 \mu\text{M SiOH}_4$):**
- i. Transferir 2 g de SiO_2 de alta pureza a un crisol de platino y colocar sobre un mechero por 5 minutos. Colocar el crisol en un desecador y permitir que enfríe.
 - ii. Pesar 0,6008 g del SiO_2 seco y colocar en el crisol de platino.
 - iii. Pesar 4 g de carbonato de sodio (Na_2CO_3) y colocar sobre el SiO_2 (Figura 12.2A).
 - iv. Tapar el crisol y colocar sobre el mechero a un ángulo como indica la Figura 12.2B.
 - v. Mantenerse alejado de la llama azul, y calentar hasta oír un crujido; retirar el mechero. Volver a colocar el mechero y volver a calentar hasta oír el crujido nuevamente. Repetir esta operación hasta que no se repita el crujido. Una vez llegado a este punto, calentar por 20 minutos más.
 - vi. Retirar el mechero y dejar enfriar.
 - vii. Transferir (usando una espátula y ADI) el disco de sílice fundida a un vaso de precipitado de teflón. Permitir que se disuelva (esto toma de 30 a 45 minutos).
 - viii. Transferir la solución de sílice a un frasco volumétrico de 500 mL y aforar con ADI. Realizar este procedimiento rápidamente de manera de evitar contaminación por parte del vidrio. Si requiere más de 500 mL, preparar dos soluciones de 500 mL y combinar.
 - ix. Llevar el pH de la solución a 9,5 utilizando HCl al 10%.
 - x. Almacenar en un recipiente de polietileno (nunca de vidrio) a temperatura ambiente. Nunca refrigerar, ya que puede ocurrir precipitación con el cambio de temperatura.
- e. **Estándar B para fosfato y nitrato ($75 \mu\text{M HPO}_4^{2-}$ y $375 \mu\text{M NO}_3^-$).** Transferir 30 mL del estándar A de fosfato y 10 mL del estándar A de nitrato a diferentes matraces volumétrico de 1000 mL. Diluir hasta el aforo con ADI.
- f. **Estándar B para ácido silícico ($2.000 \mu\text{M SiOH}_4$).** Transferir 100 mL del estándar A de ácido silícico a un matraz volumétrico de 1000 mL. Diluir hasta el aforo con ADI.
- g. **NO ES NECESARIO PREPARAR UN ESTÁNDAR B PARA AMONIO Y NITRITO, YA QUE EL ESTÁNDAR A DE AMBOS SE ENCUENTRA EN CONCENTRACIONES SUFICIENTEMENTE DILUIDAS.**
- h. **Soluciones de trabajo estándar C.** Preparar tres soluciones del estándar C con concentraciones diferentes para cada nutriente a ser analizado (C1 – C4, siendo C4 la más concentrada y C1 el blanco de AMBN). La Tabla 12.1 indica el volumen necesario del estándar B (o A en el caso de amonio y nitrito) que se debe transferir a un matraz volumétrico de 250 mL para generar los estándares de trabajo C2-C4. Los estándares A y B se diluyen con AMBN en diferentes proporciones para generar los estándares de trabajo. Las diluciones proporcionadas en este documento son las adecuadas para aguas de surgencia con cierto nivel de anoxia. Para otros sistemas es necesario ajustar las diluciones de acuerdo al rango de concentración de los nutrientes.
- i. **Agentes surfactantes.** Dodecilsulfato sódico de alta pureza ($\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{11}\text{OSO}_3\text{Na}$) se usa para el método del ácido silícico y fosfato, y Brij-35 para el análisis de nitrato + nitrito.

Análisis de Nutrientes

La siguiente sección detalla la metodología empleada para el análisis de nutrientes empleando un AA-II. Mantener un patrón regular de burbujas limpiando los canales de flujo diariamente con una solución de 1,2 M HCl (HCl al 10%). Emplear ADI para enjuagar todos los tubos. Ocasionalmente, lavar con 2,5 M NaOH. Purgar todos los reactivos fuera del sistema, para que no precipiten con los ácidos o bases usados para el lavado. Si el patrón de burbujas se interrumpe, lavar todo el sistema y no tratar de reiniciarlo inmediatamente. La bomba peristáltica y la barra segmentadora (“air bar”) son los encargados de generar el flujo segmentado.

Fosfato

Este procedimiento describe el método para la determinación de fosfato en agua de mar utilizando una modificación del procedimiento de Bernhardt y Wilhelms (1967). Los resultados se expresan en $\mu\text{mol L}^{-1}$ (o μM) de HPO_4^{2-} . Los diagramas de flujo para el AA-II se encuentran en la Figura 12.3. Para este sistema se utilizan celdas de flujo de 5cm y fototubos S1 de alto rango. Este método tiene una respuesta lineal de hasta $5,0 \mu\text{M HPO}_4^{2-}$.

Fundamentos del Método

Los iones de ortofosfatos disueltos (H_2PO_4 , HPO_4^{2-} y PO_4^{3-}) en una muestra de agua de mar reaccionan con el molibdato de amonio en un medio ácido para formar un compuesto complejo conocido como ácido molibdofosfórico. Este complejo se reduce al añadir sulfato de hidracina obteniéndose una solución de un color azul intenso. El flujo de la muestra en el autoanalizador se calienta para acelerar la reacción.

Reactivos

Seguir las instrucciones de Gordon *et al.* (2000) para la preparación de los reactivos.

Nitrato + nitrito

Este procedimiento describe el método para la determinación de nitrato + nitrito en agua de mar utilizando una modificación del procedimiento de Armstrong *et al.* (1967). Los resultados se expresan en μM de $\text{NO}_3^- + \text{NO}_2^-$. Los diagramas de flujo para este análisis se encuentran en la Figura 12.4.

Fundamentos del Método

El nitrato presente en la muestra se reduce a iones de nitrito cuando la muestra pasa a través de una columna de Cd-Cu en forma casi cuantitativa (> 95%). Estos iones de nitrito representan el nitrato reducido más los iones de nitrito originales. Estos iones reaccionan en un medio ácido con dos aminas aromáticas (sulfanilamida y clorhidrato N-1-naftil etiléndiamina) para formar un compuesto azo de color rojizo. La diferencia entre la concentración de nitrito de una muestra reducida y la de una muestra sin reducir representa la concentración de nitrato presente en la muestra.

Reactivos

Seguir las instrucciones de Gordon *et al.* (2000) para preparar los reactivos y la columna de Cd-Cu. La Figura 12.5 muestra la columna de Cd-Cu adecuada para un AA-II donde:

- | | |
|--|--------------------------------------|
| 1 = tubo de Teflón [®] (diámetro interno 1mm) | 5 = tapón de lana de vidrio |
| 2 = tubo Tygon [®] | 6 = gránulos de Cd-Cu |
| 3 = conexión Technicon N-6 | 7 = Tubo de vidrio (diámetro externo |
| 4 = tubo Tygon [®] (1/4") | ~1/4", 3" largo) |

Nitrito

Este análisis se realiza en otro canal utilizando el método descrito para nitrato + nitrito pero sin emplear la columna de reducción ni la solución de imidazol. La Figura 12.6 muestra el diagrama de flujo del sistema de nitrito. Los reactivos necesarios para este análisis son los mismos descritos para el análisis de nitratos. La sensibilidad de este análisis es aproximadamente de 0,056 AU/ μ M. Los resultados se expresan en μ M de NO_2^- .

Acido silícico

Este procedimiento describe el método para la determinación de ácido silícico en agua de mar utilizando el procedimiento de Armstrong *et al.* (1967) adaptado por Atlas *et al.* (1971). La Figura 12.7 muestra el diagrama de flujo para el sistema de ácido silícico. Este método es suficientemente sensible para medir ácido silícico en agua oceánica (aguas 'azules'). Los resultados se expresan en μ M de $\text{Si}(\text{OH})_4$.

Fundamentos del Método

Al agregar ácido molíbdico a la muestra se forma un compuesto complejo llamado ácido β -silicomolibdico debido a la reacción entre el reactivo de molibdato de amonio en un medio ácido y el ácido silícico que contiene la muestra. Al añadir cloruro de estaño, este complejo se reduce formandose una solución de color azul. Las fluctuaciones de temperatura afectan el desarrollo del color; por lo tanto, proteger la serpentina de vidrio de corrientes de aire y controlar la temperatura en la serpentina durante el análisis (Knap *et al.*, 1997).

Reactivos

Seguir las instrucciones de Gordon *et al.* (2000) para la preparación de los reactivos.

Amonio

De acuerdo a Gordon *et al.* (2000), la determinación de amonio que se presenta fue modificada a partir del método ALPKEM RFA, tomado de "Methods for Chemical Analysis

of Water and Wastes”, marzo 1984, EPA-600/4-79-020, "Nitrogen Ammonia", Method 350.1 (Colorimetric, Automated Phenate). El diagrama de flujo para este método se muestra en la Figura 12.8. El AA-II utiliza una celda de flujo de 50 mm, filtros de interferencia de 640 nm y fototubos Technicon S-10. Este método exhibe una respuesta lineal hasta por lo menos 6 μM . La sensibilidad analítica es 0,022 AU/ μM amonio.

Fundamentos del Método

El amonio presente en la muestra reacciona con fenol alcalino en un medio básico en presencia de hipoclorito de sodio que actúa como agente oxidante para formar el complejo indofenol azul. Debido al pH alto, un agente acomplejante se utiliza para remover el exceso de iones de magnesio que se forman durante la reacción los cuales interfieren en el análisis.

Reactivos

Seguir las instrucciones de Gordon *et al.* (2000) para la preparación de los reactivos.

Análisis de Muestras

A continuación se resumen los pasos para realizar una corrida de análisis de muestras de agua de mar a través del sistema de AFC.

1. ***Encendido del equipo y establecimiento de la línea base***
 - a. Revisar los niveles de ADI y soluciones de lavado (ADI y surfactantes) en las botellas y llenar aquellas que lo requieran.
 - b. Iniciar el bombeo y purgar el sistema por lo menos por 10 minutos. Cuanto mayor tiempo dure el lavado y la purga mejor serán las corridas.
 - c. Mientras se realiza la purga del sistema, revisar el volumen de todos los reactivos, completando aquellos que lo requieran y preparar soluciones de trabajo nuevas, si es necesario.
 - d. Asegurar el flujo constante de aire y la presencia de burbujas en el sistema de flujo. Esto garantiza la purga adecuada del aire fuera del sistema.
 - e. Una vez finalizada la purga, revisar las escalas de voltaje (cero y máximo, 5V FS) en el equipo y ajustar estos extremos según como convenga.
 - f. Añadir los reactivos colocando los tubos de reactivo de sus botellas de lavado en sus botellas de reactivo correspondientes.

NOTA. En el canal del ácido silícico es necesario esperar por lo menos 5 minutos antes de añadir el SnCl_2 después de agregar el ácido tartárico y el molibdato. Una adición prematura del SnCl_2 puede conducir en la formación de un precipitado azul oscuro en las paredes de tubos y serpentinas. Si esto ocurre, purgar el sistema con NaOH para disolver y remover el precipitado.

- g. Es importante asegurar la purga de todo el sistema con solución amortiguadora (Imidazol) antes de introducir la columna de Cd-Cu. Usualmente esta solución recorre el sistema de 3 a 5 minutos después que empieza el bombeo.

- h. Cuando los reactivos llegan a los colorímetros se observan cambios en la línea base del detector. En este punto, anotar la diferencia (en unidades de gráfico) entre la línea base original, usando ADI, y la nueva línea base usando los reactivos. Esta diferencia debe ser consistente día tras día, y es un buen mecanismo para revisar el correcto funcionamiento del sistema (lo contrario indica deterioro de los reactivos o descalibración de los colorímetros).
- i. Permitir que el instrumento registre la nueva línea base por 10-20 unidades de gráfico hasta obtener una línea base estable donde se puedan observar cambios irregulares. Si la línea base tiene ruido, revisar que no haya burbujas atascadas dentro del sistema. Usualmente si se pellizca el tubo de flujo de salida de la celda dentro del colorímetro por varios segundos soluciona el problema.
- j. Si la línea base no presenta ruido, iniciar la corrida de las muestras. Colocar el tubo de lavado (que llena el automuestreador) en AMBN. Observar el detector y esperar por el cambio de señal que indique que el AMBN está fluyendo por el sistema y alcanzado los colorímetros (alrededor de 20 minutos).

NOTA. Es importante identificar debidamente las botellas correspondientes a cada estándar de trabajo y al ADI, para evitar confusiones al momento de la corrida.

2. *Corrida de las muestras*

- a. Usualmente se corren los estándares de trabajo antes y entre las muestras. La corrida de estándares/muestras consiste en:
 - Una corrida con el estándar de trabajo C4.
 - Dos corridas con el estándar C1 (AMBN).
 - Tres corridas con el estándar de trabajo C4.
 - Tres corridas con el estándar de trabajo C3.
 - Tres corridas con el estándar de trabajo C2.
 - Tres corridas con el estándar C1 (AMBN).
 - Tres lavados con ADI.
 - Corrida del primer grupo de muestras de agua de mar, corriendo por duplicado la primera muestra.
 - Después de 12 muestras, correr una línea base con AMBN, para verificar que la deriva del equipo es menor a dos unidades gráficas.
 - Terminar de correr las muestras, repitiendo después de 12 muestras (en caso necesario) la línea base de AMBN.
 - Una corrida con AMBN.
 - Tres lavados con ADI.
 - Tres corridas con el estándar C1 (AMBN).
 - Tres corridas con el estándar de trabajo C2.
 - Tres corridas con el estándar de trabajo C3.
 - Tres corridas con el estándar de trabajo C4.
 - Permitir que la línea base corra por unos 5 minutos.

NOTA. Una corrida mayor de 12 muestras usualmente toma varias horas. Hay un retraso entre el momento de introducir la muestra al sistema y el tiempo que tarda el colorímetro en detectarla (para el amonio, el tiempo de retraso puede ser de hasta 20 minutos). Permitir que la línea base corra por 5 minutos antes de iniciar una segunda corrida o culminar la presente corrida.

Durante el proceso, las burbujas de aire deben tener un patrón regular. Revisar por ruido o cambios súbitos en las mediciones del colorímetro en el detector, así como en el tubo extractor. Este tubo debe tomar correctamente la muestra de cada botella y evitar que, por mal posicionamiento o movimiento de las botellas sobre el carrusel succione aire. Verificar los niveles de los reactivos durante una corrida. Para evitar la deriva de los instrumentos, las corridas deben ser breves, de manera que el tiempo que pasa entre el inicio y el final no exceda 90 minutos.

3. *Purga y apagado del sistema*

- a. Una vez que la línea base haya corrido por 5 minutos, se puede comenzar a lavar el sistema y apagarlo. El lavado es fundamental para evitar la formación de precipitados en las paredes de los tubos y serpentinas del sistema.
- b. Apagar el detector y cerrar el programa de adquisición de datos.
- c. Remover la columna de Cd-Cu del sistema cuidadosamente de manera de no introducir aire dentro de la columna.
- d. Retirar todos los reactivos, excepto el ácido tartárico, y colocar todos los tubos en sus reservorios con el agua de lavado correspondiente. Una vez que se purgue el SnCl₂ completamente del sistema, colocar el tubo del ácido tartárico en su reservorio de lavado. Esto es importante para evitar la formación de precipitado.
- e. Usando el auto-muestreador, realizar la corrida de dos botellas con HCl al 10%, dos botellas con NaOH 1M y dos botellas con HCl al 10% a través de todo el sistema.
- f. Purgar el sistema con ADI por unos 10-15 minutos antes de apagar la bomba.

Cálculo y Expresión de Resultados

Para el calculo y expresión de resultados, ver Gordon *et al.* (2000).

Referencias

- Armstrong, F.A.J.; Stearns, C.R.; Strickland, J.D.H.. (1967). The measurement of upwelling and subsequent biological processes by means of the Technicon_AutoAnalyzer and associated equipment. *Deep-Sea Research*. 14(3): 381-389.
- Atlas, E.L.; Hager, S.W.; Gordon, L.I.; Park, P.K. (1971). A practical manual for use of the Technicon_Autoanalyzer_in seawater nutrient analyses; revised. Technical Report 215. Oregon State University, Dept of Oceanography, Ref. No. 71-22. 48 pp.
- Bernhardt, H.; Wilhelms, A.. (1967). The continuous determination of low level iron, soluble phosphate and total phosphate with the AutoAnalyzer. *Technicon Symp*, Vol. I, p. 386.
- Gordon L.I.; Jennings Jr, J.C.; Ross, A.A.; Krest, J.M. (2000). A Suggested Protocol For Continuous Flow Automated Analysis of Seawater Nutrients. En: WOCE Operation Manual, WHP Office Rept 90-1, WOCE Rept 77 No 68/91, 1-52.

Knap, A.H.; Michaels, A. F.; Steinberg, D.; Bahr, F.; Bates, N.; Bell, S.; Countway, P.; Close, A.; Doyle, A.; Dow, R.L.; Howse, F.; Gundersen, K.; Johnson, R.; Kelly, R.; Little, R.; Orcutt, K.; Parsons, R.; Rathbun, C.; Sanderson, M.; Stone, S. (1997). BATS methods manual. Version 4. U.S. JGOFS Planning Office, Woods Hole, 136 pgs.

Weast, R.C.; Astle, M.J.; Beyer, W.H. Eds. (1985). CRC Handbook of Chemistry and Physics. 66th. edition.

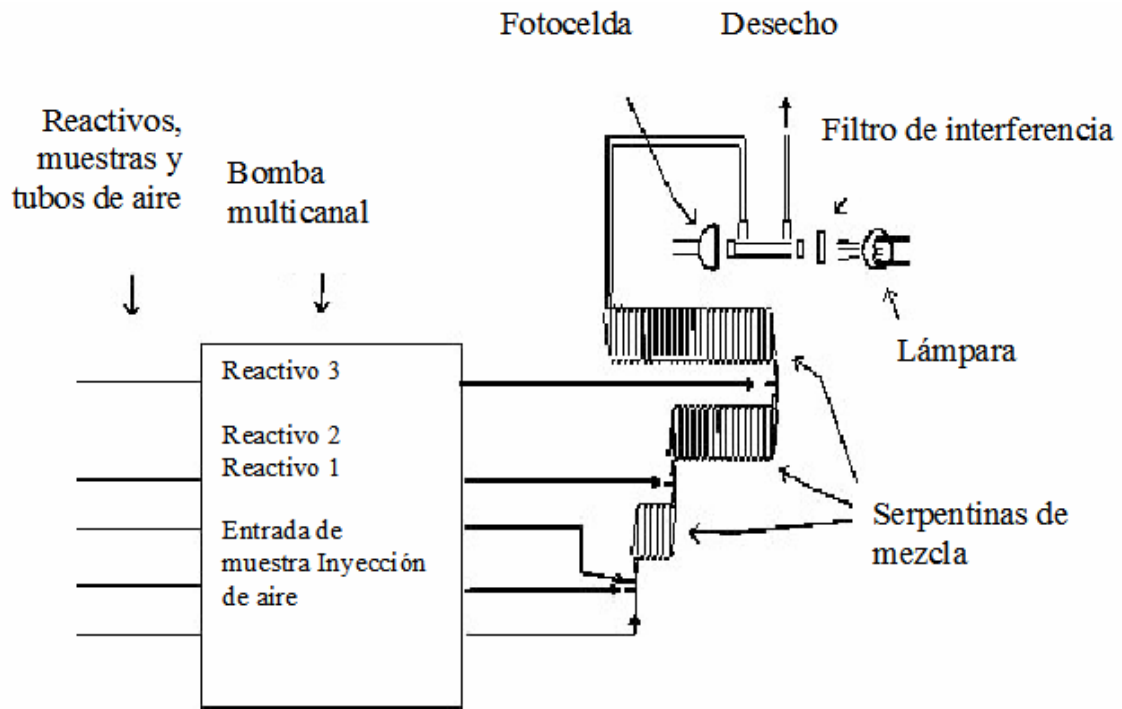
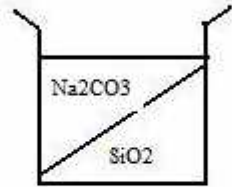


Figura 12.1. Principales componentes de un sistema de AFC. Reproducido de Gordon et al. (2000) con permiso.

A



B

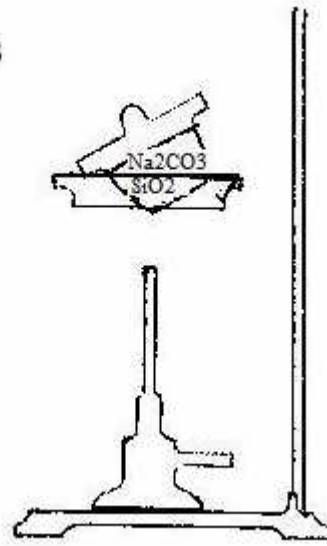


Figure 12.2. Esquema para la preparación del estandar de ácido silícico.

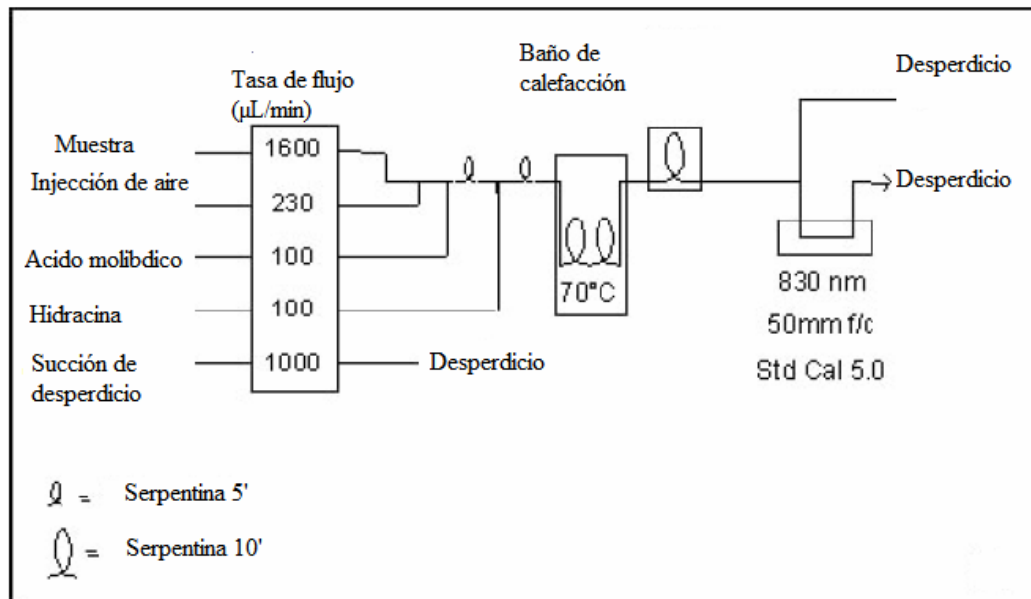


Figura 12.3. Diagrama de flujo para el método de fosfato. Reproducido de Gordon et al. (2000) con permiso.

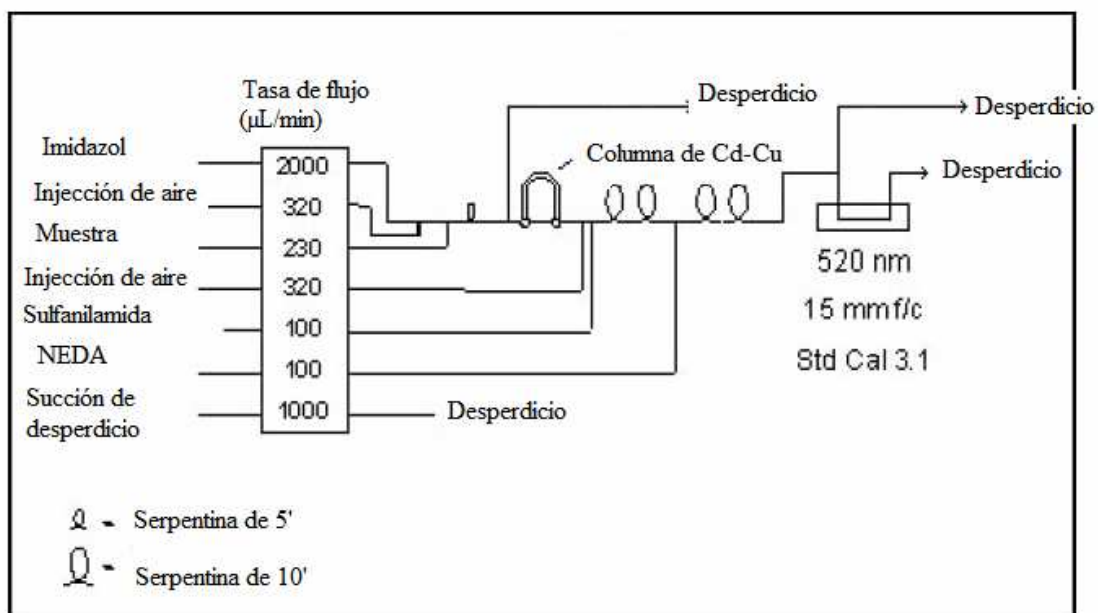


Figura 12.4. Diagrama de flujo del sistema de nitrato. Reproducido de Gordon et al. (2000) con permiso.

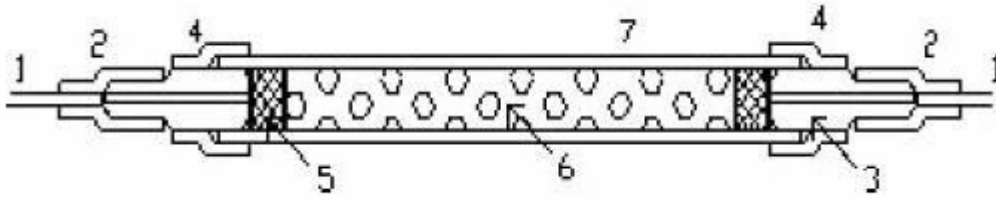


Figura 12.5. Columna de Cd-Cu empacada para uso en un AA-II. Reproducido de Gordon et al. (2000) con permiso.

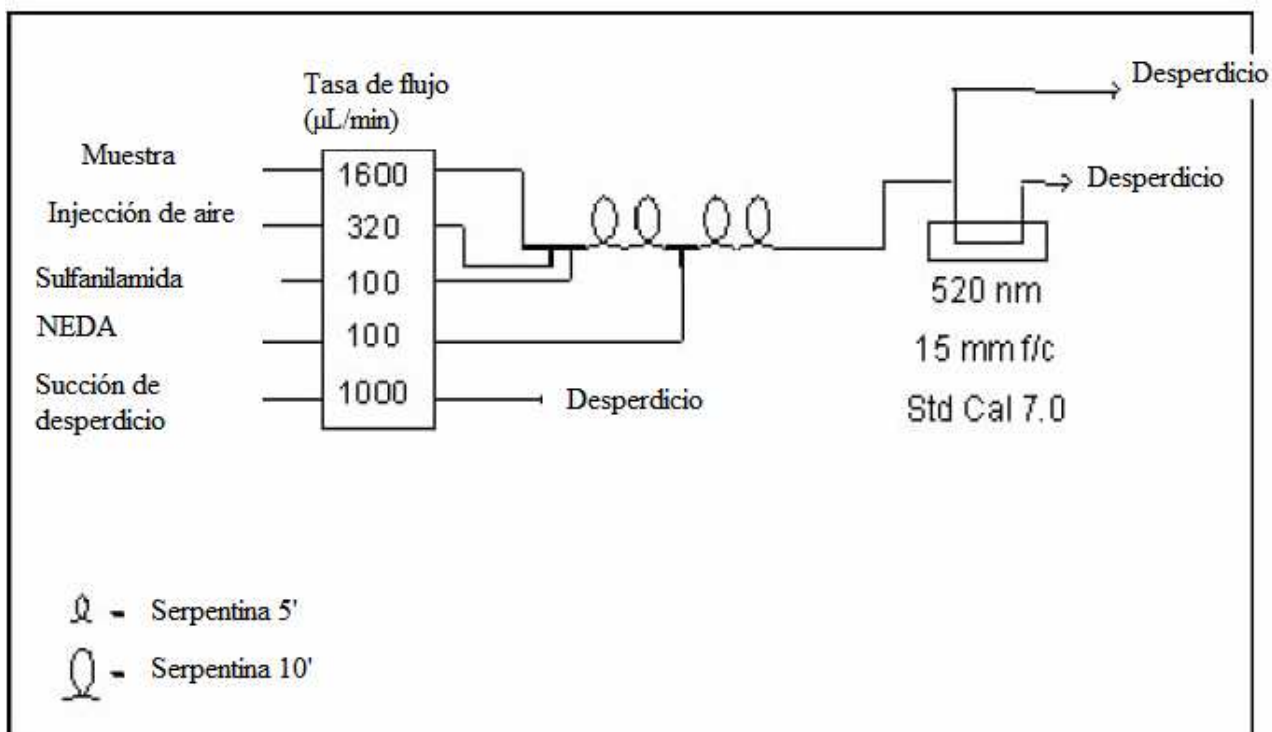


Figura 12.6. Diagrama de flujo para el método de nitrito. Reproducido de Gordon et al. (2000) con permiso.

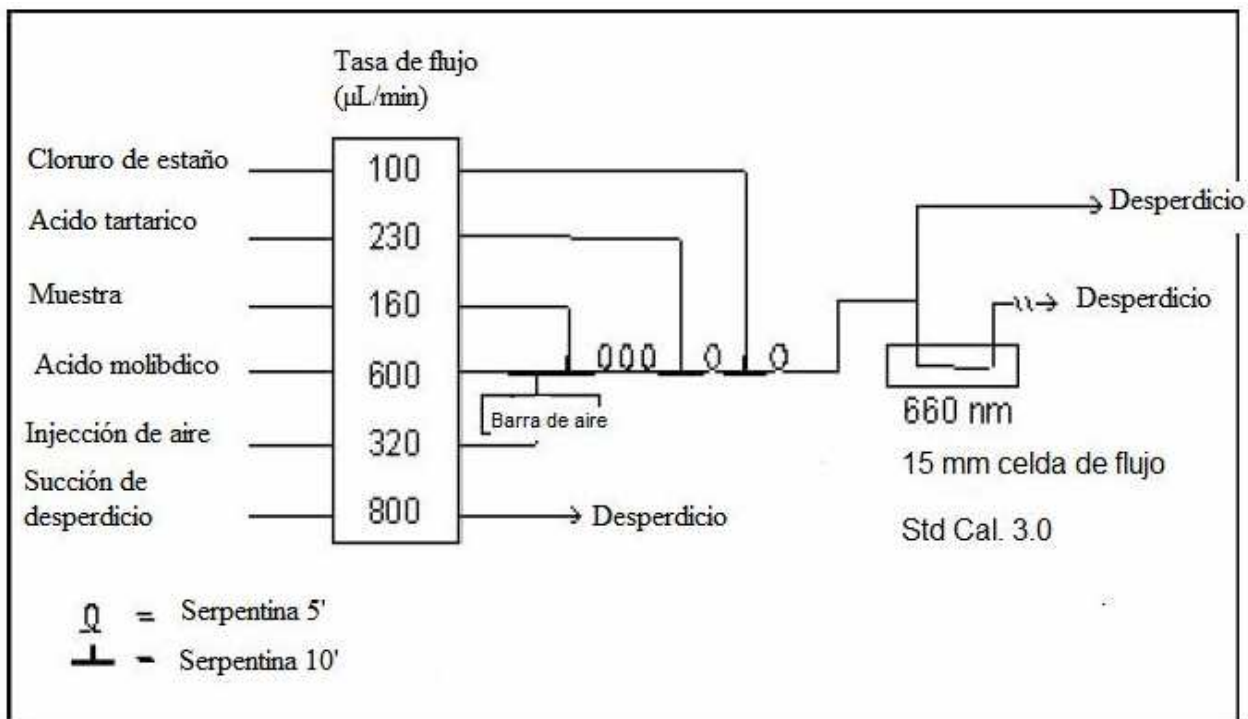


Figura 12.7. Diagrama de flujo para el sistema de ácido silícico. Reproducido de Gordon et al. (2000) con permiso.

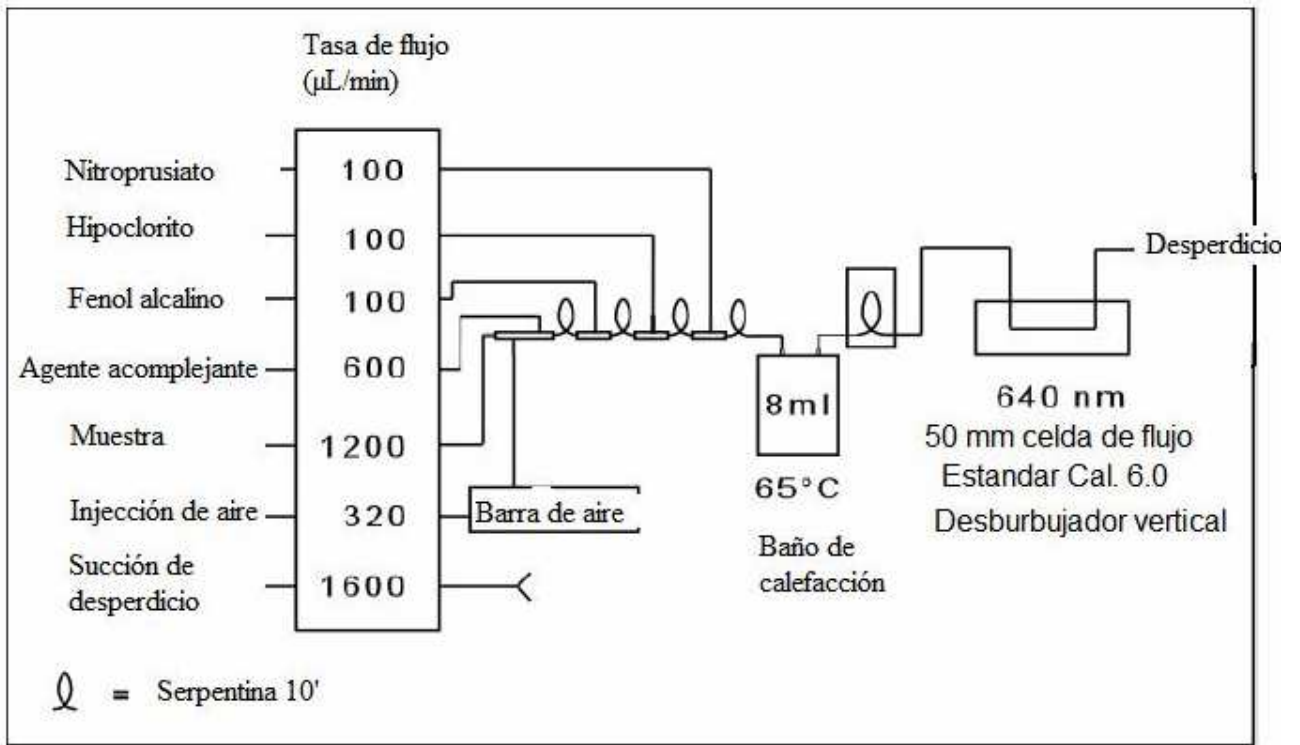


Figura 12.8. Diagrama de flujo para el sistema de amonio. Reproducido de Gordon et al. (2000) con permiso.

Tabla 12.1. Volumen del estandar B (o A en caso del amonio y nitrito) para preparar soluciones estandar C. AMBN es agua de mar baja en nutrientes.

Nutrientes	Fosfato	Nitrato	Acido silícico	Nitrito	Amonio
Soluciones estándar					
C4	15 mL	15 mL	10 mL	0.25 mL	0.25 mL
C3	10 mL	10 mL	5 mL	0.1 mL	0.1 mL
C2	5 mL	5 mL	2.5 mL	0.05 mL	0.05 mL
C1	AMBN	AMBN	AMBN	AMBN	AMBN

Método 13. Determinación de Clorofila *a* y Feopigmentos

Ramón Varela

Introducción

La determinación de clorofila *a* se emplea para estimar la biomasa de los productores primarios (fitoplancton) que se encuentran como partículas en suspensión en el agua. El procedimiento que se describe a continuación cuantifica la concentración de clorofila *a* y feopigmentos presentes en una muestra utilizando técnicas fluorométricas. El procedimiento sigue los lineamientos propuestos por Holm-Hansen *et al.* (1965), y los cálculos se efectúan como se indican en Lorenzen (1966). Entre las modificaciones se encuentran el uso de metanol en vez de acetona como un disolvente de extracción debido a su mayor eficiencia (Holm-Hansen y Riemann, 1978) y el empleo de un sonificador (Wright *et al.*, 1997). Este método se puede aplicar en todos los rangos de concentración de clorofila *a* que se encuentran en el mar. El límite de detección del método es de $0,01 \mu\text{g L}^{-1}$ para aguas naturales (muestra de 0,5 L). Los resultados se expresan en $\mu\text{g L}^{-1}$ ó mg m^{-3} .

Fundamentos del Método

Una muestra de agua de mar se filtra a través de un filtro de fibra de vidrio sobre el cual se retienen las partículas en suspensión. Entre estas partículas se encuentran organismos del fitoplancton los cuales poseen pigmentos clorofílicos como clorofila *a* y feopigmentos. La extracción de estos pigmentos de las células se efectúa usando metanol como disolvente, y el ultrasonido (sonificación) se usa para romper el filtro y las células. Luego de aclarar el extracto por centrifugación se coloca en un fluorómetro donde los pigmentos de las algas se excitan con luz de longitud de onda azul, emitiendo fluorescencia con longitud de onda roja. La fluorescencia se detecta por medio de un fotomultiplicador. Seguidamente, la muestra se acidifica para convertir toda la clorofila *a* en feopigmentos y se mide en el fluorómetro nuevamente.

Interferencias

1. La presencia de clorofila *b*, clorofila *c* y/o divinil clorofila *a* en la muestra pueden acarrear error en la medición. Concentraciones elevadas de clorofila *b*, especialmente en la zona del máximo de clorofila, interfieren en forma negativa con la clorofila *a* y positiva con los feopigmentos (Knap *et al.*, 1997). Esta interferencia es importante si son abundantes algas pertenecientes a la clase clorofíceas y/o proclorofitas.
2. El límite de detección del equipo se sobrepasa cuando el nivel de los pigmentos en los extractos es muy alto. El fluorómetro siempre se mantiene en su máxima sensibilidad; por lo tanto, las mediciones tienden a subestimar concentraciones elevadas, posiblemente por efecto de la extinción (“quenching”). Para solventar este problema, existen varias alternativas. Una alternativa no muy recomendable es diluir la muestra lo cual aumenta la incertidumbre del método. Si el filtro se encuentra saturado de material después de la filtración, otra opción es cortar el filtro en fracciones más pequeñas y realizar el análisis por separado a cada fracción. La alternativa más recomendable en aguas muy productivas con una concentración elevada de fitoplancton es filtrar un volumen menor de agua (250 mL ó menos) de manera de evitar cortar el filtro o diluir la muestra.

3. La fluorescencia depende de la temperatura. Por lo tanto, realizar la calibración del equipo así como el análisis de muestras a una temperatura ambiental constante entre 20-25 °C. El coeficiente de temperatura para la fluorescencia de la clorofila es - 0,3%/°C.
4. La luz intensa puede degradar con rapidez la clorofila. Realizar todo el análisis en un ambiente con luz tenue.
5. Tanto el material que se emplea en el análisis como el metanol deben permanecer libres de residuos de ácido.

Materiales

1. Filtros de fibra de vidrio (Whatman grado GF/F ó su equivalente, 0,7 µm, 25 mm).
2. Unidad de filtración y bomba de vacío.
3. Embudos para filtros de 25 mm, 200 mL de capacidad.
4. Tubos de centrifuga de polipropileno con tapa, 15 mL.
5. Celdas de 13-mm específicas para el fluorómetro.
6. Pipetas automáticas monocanal con capacidad de 200 y 1000 µL.
7. Pipetas de 5 y 10 mL.
8. Espátulas pequeñas.
9. Guantes de vinilo.

Equipos

1. Fluorómetro Turner Designs, con fotomultiplicador sensitivo al rojo (λ 185-870 nm), lámpara F4T5D (10-AU-005), filtro azul (λ 340 – 500 nm CS 5-60) y filtro rojo (λ > 665 nm CS 2-64).
2. Sonificador, Fisher Scientific modelo 100.
3. Centrifuga, 0 - 3900 r.p.m.
4. Unidad de filtración y bomba de vacío.

Reactivos

1. **Metanol** (CH₃OH).
2. **Ácido clorhídrico** (HCl, 0,48 N).
3. **Solución concentrada de clorofila a**. Se emplea una ampolla de solución estándar comercialmente disponible de clorofila *a* pura (*Anacystis nidulans* Sigma C-6144, 1 mg) libre de clorofila *b*. Disolver el contenido de una ampolla con cristales de clorofila *a* en 15 mL de metanol. Los cristales de clorofila se disuelven muy lentamente; por lo tanto, realizar la dilución dos días antes de la calibración. Una vez disuelta, mantener esta solución almacenada a - 20 °C.
4. **Solución de trabajo para la calibración**. Diluir 1 mL de la solución concentrada de clorofila *a* en 49 mL de metanol. La concentración de esta solución debe ser aproximadamente de 1 µg L⁻¹. Para determinar la concentración precisa, medir la absorción a cada nanómetro entre 660 y 670 nm empleando un espectrofotómetro recién calibrado y ubicar la longitud de onda con absorción máxima (A_{max}). Determinar la concentración de clorofila en la solución aplicando la siguiente formula:

$$\text{Clorofila } a = \left[\frac{(A_{\max} - A_{750\text{nm}})}{E * L} \right] * \frac{1000\text{mg}}{1\text{g}} \quad (1)$$

donde

A_{\max} = absorción máxima (entre 660 - 670 nm).

$A_{750\text{nm}}$ = absorbancia a 750 nm.

E = coeficiente de absorción específica de la clorofila en metanol, $79,81 \text{ g}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Jeffrey y Welschmeyer, 1997).

L = longitud de la celda en cm, 10-cm.

Limpieza del Material.

Sumergir todo el material de vidrio (celdas, pipetas, etc.) en una solución de HCl al 10% durante 24 horas. Enjuagar cinco veces con agua destilada y secar. Mantener las celdas del fluorómetro boca abajo para evitar que penetren partículas de polvo. Lavar las pinzas, espátulas, y cualquier otro material que no sea de vidrio con detergente líquido, agua corriente y finalmente con agua destilada. Usar guantes en todo momento.

Captación de Muestras

1. Captar las muestras de agua en botellas oscuras de polietileno de 1 L lavando tres veces con la muestra antes de llenar.
2. Filtrar la muestra inmediatamente a través de filtros de fibra de vidrio. Anotar el volumen filtrado. El volumen a filtrar depende de la cantidad de clorofila presente en el agua, lo cual se puede estimar a través del fluorómetro del CTD. Para las aguas con biomasa baja ($< 1 \text{ mg m}^{-3}$) se filtran 500 mL por duplicado. Filtrar 250 mL por triplicado si la biomasa es $> 1 \text{ mg m}^{-3}$.
3. Mantener el nivel de vacío de la bomba $< 100 \text{ mm Hg}$ para no romper las células.
4. Al finalizar la filtración, sacar el filtro con una pinza plana y doblarlo por la mitad ó enrollarlo con el lado que contiene las partículas hacia adentro. Introducir el filtro en un tubo de centrifuga debidamente identificado.
5. Congelar a $- 20 \text{ }^\circ\text{C}$. Realizar el análisis antes de un mes.

Análisis del Blanco

Antes de realizar el análisis de clorofila a es imprescindible evaluar el funcionamiento del fluorómetro así como la calidad analítica del metanol con un análisis del blanco. El metanol debe estar libre de contaminantes ó de algún otro elemento que pueda alterar los resultados del análisis.

1. Colocar 5 mL de metanol con una pipeta limpia en una celda del fluorómetro.
2. Realizar una lectura en el fluorómetro. Una lectura mayor de cero indica posible contaminación del reactivo ó un equipo descalibrado; por lo tanto, **NO SE DEBE** realizar el análisis hasta calibrar el equipo ó cambiar de reactivo.
3. Es conveniente verificar la estabilidad del equipo antes del análisis utilizando un estándar sólido suministrado por el fabricante. Este estándar se ajusta durante la calibración.

Análisis de Muestras

Se recomienda comenzar el análisis a partir de las muestras con menor concentración y terminar con las que posean la mayor concentración (usualmente las superficiales). Realizar los duplicados en forma simultánea. Usar guantes en todo momento durante el análisis y atender las medidas de seguridad para el manejo del metanol.

1. *Preparación de las muestras antes del análisis. Sonificación.*

- a. Sacar los tubos de centrifuga con los filtros del congelador y descongelar a temperatura ambiente a resguardo de la luz.
- b. Agregar a cada tubo 10 mL de metanol puro sin formar burbujas. Verificar que todos los tubos contengan la misma cantidad del líquido y que el filtro quede totalmente sumergido.
- c. Romper el filtro dentro del tubo con una pequeña espátula para homogenizar la muestra. La homogenización aumenta la ruptura de las células del fitoplancton e incrementa la eficiencia de extracción del solvente. Colocar los tubos en una gradilla cubriéndolos con papel de aluminio para protegerlos de la luz.
- d. Introducir la punta del sonificador en el metanol hasta 4,5 cm por encima del fondo del tubo de centrifuga. La sonda debe estar lo más perpendicular posible y no tocar las paredes del tubo.
- e. Prender el sonificador y aumentar gradualmente la potencia hasta la posición 15.
- f. Mantener en esta lectura por 30 segundos, apagar el equipo y retirar la punta del sonificador, tapan el tubo de centrifuga y guardarlo protegido de la luz.
- g. Entre muestra y muestra, lavar la punta del sonificador con metanol puro y secar.
- h. Colocar los tubos en una gradilla y almacenar a 4 °C (no congelar) por 24 horas para permitir que el metanol extraiga los pigmentos. Es recomendable agitar ligeramente los tubos tres o cuatro veces durante este periodo.

2. *Medición de clorofila a y feopigmentos con el fluorómetro.*

Prender el fluorómetro una hora antes comenzar el análisis para permitir que estabilice.

- a. Colocar los tubos en una centrifugadora por 30 minutos a 3000 r.p.m. para clarificar el extracto.
- b. Transferir los tubos a una gradilla y ordenarlos por réplicas, protegiéndolos de la luz.
- c. Con una pipeta, extraer cuidadosamente 5 mL de metanol de la mitad superior del líquido en el tubo, sin tocar las partículas del filtro ni producir turbulencia y transvasarlo a la celda del fluorómetro.
- d. Colocar la celda en el fluorómetro previamente calibrado, y realizar la lectura una vez que el equipo estabilice (~ 8 s). Esta lectura corresponde a la fluorescencia inicial (Fo).
- e. Agregar 100 µL de HCl 0,48 N y agitar levemente. Esperar tres minutos como mínimo para que se complete la reacción.
- f. Colocar la celda en el fluorómetro y esperar que el equipo estabilice, realizar la lectura de la muestra acidificada. Esta lectura corresponde a la fluorescencia acidificada (Fa).

- g. Entre muestra y muestra, lavar la pipeta y las celdas del fluorómetro un mínimo de tres veces con metanol puro.

Calibración del Fluorómetro

El fluorómetro se calibra, siguiendo las instrucciones del fabricante, cada seis meses con un estándar, comercialmente disponible, de clorofila *a* pura (*Anacystis nidulans* Sigma C-6144, 1 mg) libre de clorofila *b*. Realizar cinco diluciones con la solución de trabajo de clorofila *a* para alcanzar concentraciones entre 0 y 130 $\mu\text{g L}^{-1}$ con lo cual se puede calibrar el equipo para una escala de valores de 0 a 150 $\mu\text{g L}^{-1}$. Una vez finalizada la calibración, medir el estándar sólido que suministra el fabricante, y utilizar esta lectura para verificar la estabilidad del equipo en análisis sucesivos. Una deriva mayor de un 10% indica la necesidad de una nueva calibración.

Las mismas diluciones se pueden emplear para determinar la razón de acidificación (*R*) después de la calibración. Tomar las lecturas de varias diluciones (F_o) y acidificar con 100 μL de HCl 0,48 N. Medir las muestras nuevamente en el fluorómetro ($F_{a_{\max}}$). *R* es la razón máxima de fluorescencia, antes y después de acidificar, calculada a partir del estándar de clorofila *a* (Sigma C-6144) usado para calibrar el fluorómetro. Para el metanol, *R* varía entre 2,4 y 2,7. Cuando se utiliza metanol, el valor de *R* es más variable que cuando se emplea acetona. La cantidad de ácido añadido a la celda debe ser fijo, igual en la calibración como para la muestra. Un incremento pequeño en el volumen produce valores de *R* anómalos.

$$R = \left(\frac{F_o}{F_{a_{\max}}} \right) \quad (2)$$

donde

$F_{o_{\max}}$ = lectura antes de la acidificación.

$F_{a_{\max}}$ = fluorescencia acidificada máxima.

Cálculo y Expresión de Resultados

La fórmula basada en Lorenzen (1966) empleada para el cálculo de la concentración de clorofila *a* y los feopigmentos en el agua de mar es:

$$\text{Clorofila } a \text{ } (\mu\text{g L}^{-1}) = \left[\frac{R}{(R-1)} \right] * (F_o - F_a) * \left(\frac{V_e}{V_m} \right) \quad (3)$$

$$\text{Feopigmentos } (\mu\text{g L}^{-1}) = \left[\frac{R}{(R-1)} \right] * ((R * F_a) - F_o) * \left(\frac{V_e}{V_m} \right) \quad (4)$$

donde

V_e = volumen de metanol (50 mL).

V_m = volumen de muestra filtrada.

F_o = lectura antes de la acidificación.

F_a = lectura después de la acidificación.

Referencias

- Knap, A.H.; Michaels, A. F.; Steinberg, D.; Bahr, F.; Bates, N.; Bell, S.; Countway, P.; Close, A.; Doyle, A.; Dow, R.L.; Howse, F.; Gundersen, K.; Johnson, R.; Kelly, R.; Little, R.; Orcutt, K.; Parsons, R.; Rathbun, C.; Sanderson, M.; Stone, S. (1997). BATS methods manual. Version 4. U.S. JGOFS Planning Office, Woods Hole, 136 pgs.
- Holm-Hansen, O.; Riemann, B. (1978). "Chlorophyll *a* determination: improvements in methodology". *Oikos*, 30: 438 – 447. Copenhagen.
- Holm-Hansen, O.; Lorenzen, C. J; Holmes, R. W; Strickland, J. D. H. (1965). "Fluorometric determination of chlorophyll". *Journal Cons. Int. Explor.Mer*, 30, 3–15.
- Jeffrey, S.W.; Welschmeyer, N.A. (1997). "Spectrophotometric and fluorometric equations in common use in oceanography. En: Phytoplankton Pigments in Oceanography. Monographs on Oceanographic Methodology, 10: 597 – 615.
- Lorenzen, C.J. (1966). "A method for the continuous measurement of in vivo chlorophyll concentration". *Deep-Sea Research*, 13: 223 - 227.
- Wright, S.W.; Jeffrey, S.W.; Mantoura, R.F.C. (1997). "Evaluation of methods and solvents for pigment extraction". En: Phytoplankton Pigments in Oceanography. Monographs on Oceanographic Methodology, 10: 261 – 282.

Método 14. Determinación de Producción Primaria

Ramón Varela

Introducción

La tasa de producción primaria se define como la cantidad de carbono inorgánico asimilado por el fitoplancton durante la fotosíntesis la cual pasa a formar parte de la materia orgánica en partículas por unidad de tiempo y de volumen ($\text{mg C m}^{-3} \text{ h}^{-1}$), ó de área superficial ($\text{g C m}^{-2} \text{ d}^{-1}$). Esta última definición se obtiene al integrar una serie de medidas de producción tomadas a distintas profundidades. La tasa de producción se puede medir usando bicarbonato de sodio marcado con carbono-14 radioactivo (^{14}C), siguiendo el método de Steeman-Nielsen (1952) con cambios indicados por Knap *et al.* (1997), IOC (1994), Strickland y Parsons (1972) y Ros (1979). Este método permite la detección de las tasas de fijación de carbono entre 0,05 y 100 $\text{mg C m}^{-3} \text{ h}^{-1}$. El procedimiento que se describe se ajusta a las condiciones de productividad elevada que se encuentran en las aguas costeras de la estación CARIACO. Específicamente, las variables que se modifican son el nivel de actividad específica de la solución de bicarbonato de sodio marcado con ^{14}C , el tiempo de incubación en el mar y el volumen de agua que se filtra luego de la incubación.

Fundamentos del Método

La asimilación del carbono inorgánico disuelto (CID) por parte del fitoplancton se estima al añadir una pequeña cantidad de ^{14}C en la forma de $\text{NaH}^{14}\text{CO}_3$ a una muestra de agua permitiendo que el fitoplancton incorpore el trazador en la materia orgánica durante la fotosíntesis. Después de agregar el ^{14}C las muestras se incuban “*in situ*” a las profundidades en las que fueron captadas originalmente por un periodo mínimo de 4 horas. Si la concentración total de CO_2 en la muestra de agua se conoce así como la cantidad de ^{14}C añadida, la tasa de producción primaria se puede calcular.

Interferencias

1. Niveles elevados de luz y cambios de temperatura pueden alterar los resultados. El fitoplancton que proviene de capas más profundas está adaptado a niveles de luz tenues; por lo tanto, cuando estos organismos se exponen a periodos breves de luz intensa, el proceso de fotosíntesis se puede acelerar o un “shock lumínico” o térmico puede ocurrir. Es importante realizar la captación, manejo y filtración de las muestras bajo condiciones de luz tenue y a una temperatura estable similar a la temperatura superficial del mar.
2. La contaminación con metales trazas como el Cu, Zn y Fe inhibe la fijación de carbono. Evitar la contaminación siguiendo las técnicas recomendadas para la limpieza del material, incluyendo las botellas Niskin. Una limpieza adecuada de los instrumentos y recipientes empleados durante el análisis asegura la calidad de los datos. Aplicar un protocolo estricto con todo el material e instrumentos que entran en contacto con la solución del ^{14}C de manera de evitar la contaminación por parte del radioisótopo tanto durante su manipulación como en el área de trabajo. Es importante un especial cuidado con las pipetas y evitar el arrastre del radioisótopo entre muestras. Emplear bandejas y papel absorbente para contener los derrames, y seguir las técnicas de seguridad recomendadas al respecto.

3. El CO₂ en las muestras de agua de mar puede escapar fácilmente hacia la atmósfera; por lo tanto, las alícuotas tomadas de los matraces de incubación para medir la radiación se preservan al agregarlas en viales que contengan 200 µL de 2-feniletilamina, una solución que absorbe CO₂.

Materiales

Usar solamente HCl y agua destilada para lavar el material que entra en contacto con la muestra. No usar detergentes ni agentes desinfectantes ya que esto podría afectar la actividad de los organismos. Usar guantes de polietileno ó vinilo en todo momento para el manejo de los materiales y la preparación de reactivos, tanto por razones de seguridad como para evitar contaminar las muestras.

1. Matraces de filtración de vidrio de 2 L.
2. Embudos de policarbonato de 250 mL para filtros de 25 mm de diámetro.
3. Filtros de fibra de vidrio Whatman GF/F, 25 mm de diámetro.
4. Pipetas automáticas monocanal con capacidad de 200 y 1000 µL.
5. Matraces erlenmeyer de policarbonato con tapa de rosca de 300 mL para la incubación (agrupados en 4 por profundidad más un quinto para el blanco).
6. Jeringas de plástico de 60 mL.
7. Viales estándares de centelleo de 20 mL.
8. Guantes de vinilo/polietileno (sin talco).
9. Bandeja para retener derrames y papel absorbente para usar con la unidad de filtración.
10. Boya, sogas con enganches para los matraces y lastres.

Reactivos

1. *Solución de trabajo de bicarbonato de sodio marcado con ¹⁴C*, (NaH¹⁴CO₃), con una actividad aproximada de 11 µCi mL⁻¹. Ver **Apendice 1** para la preparación de esta solución.
2. *Acido clorhídrico* (HCl, 0,5 N).
3. *2-feniletilamina* (C₆H₅CH₂CH₂NH₂), Sigma-Aldrich, Inc., P-2641.
4. *Líquido de centelleo (CytoScint[®])*, u otro similar compatible con muestras acuosas.

Equipo

1. Unidad de filtración con bomba de vacío.
2. Contador de centelleo liquido PerkinElmer BetaScout 2007-0010.

Captación de muestras

Usar guantes de polietileno o de vinilo en todo momento durante la toma y el análisis de las muestras. Ver la Figura 14.1 para detalle esquemático del muestreo.

Horas antes de la salida

1. Lavar todo el material que se emplea en el campo con HCl al 1% y agua destilada. Evitar el contacto con objetos metálicos. Si los matraces erlenmeyer son nuevos, sumergirlos en HCl al 5% por 72 horas. Enjuagar tres veces con agua desionizada. Mantener los matraces entre cruceros conteniendo 100 mL de HCl al 1% mientras no se utilizan.
2. Lavar las puntas de las pipetas con HCl al 5% y enjuagar cuatro veces con agua destilada. Secar y guardar las puntas en un guante de polietileno ó en una bolsa plástica con cierre hermetico hasta su uso.
3. En una campana de extracción, agregar 200 μL de 2-feniletilamina a cada uno de los viales de centelleo que van a recibir una alícuota de agua durante el análisis. Marcar estos viales como **S**.
4. Calcular el volumen exacto de la solución de trabajo del bicarbonato marcado que se agrega a cada matraz de incubación, en función de su actividad, la cual se debe medir previamente con el contador de centelleo (punto i en **NOTA 1**).

En el campo

1. Realizar la captación de muestras una ó dos horas antes del amanecer de manera de tener suficiente tiempo para preparar el despliegue *in situ* de la boya de incubación antes de que la luz solar sea intensa. Captar cinco muestras de agua en matraces de policarbonato para cada profundidad directamente de la botella Niskin. Enjuagar tres veces con la muestra, llenar dejando un pequeño espacio de aire. Tres de los matraces van a estar expuestos a la luz (**L**), el cuarto matraz corresponde a la medición en oscuridad (**D**), y el quinto se utiliza para la medición de los blancos (**B**) los cuales solo se requieren en algunas profundidades. En CARIACO, la producción primaria se mide en 8 profundidades: 1, 7, 15, 25, 35, 55, 75 y 100 m, lo que abarca en este caso la totalidad de la zona eufótica.
2. Guardar los matraces llenos separados por profundidad en cajas o bolsas negras protegidas de la luz mientras se recogen todas las muestras de la roseta.
3. En el laboratorio del barco y bajo condiciones de luz tenue, añadir la solución de trabajo del bicarbonato marcado ($\sim 11 \mu\text{Ci mL}^{-1}$) a todos los matraces **L** y **D**. El volumen que se agrega a cada matraz debe suministrar una actividad de 4 μCi .
4. Extraer 200 μL de agua de uno de los matraces **L** por cada profundidad y se verter en un vial marcado **S** (que contiene 2-feniletilamina), identificar cada vial según la profundidad de origen (**Sz**). Este paso se hace para determinar los niveles de radiación añadida a los matraces. Forrar adecuadamente cada matraz **D** con papel de aluminio, ya que estos representan la botella oscura la cual mide la fijación de carbono en la oscuridad, uno por cada profundidad.
5. Extraer 200 μL de cada matraz sin ^{14}C (blanco, **B**) de cada profundidad y transferir a viales marcados como **So**. Esto mide la radiación natural de fondo del agua de mar y las partículas.
6. A continuación se toman 2 alícuotas de 30 μL de la solución de trabajo de bicarbonato para determinar la actividad de la solución. Transferir a dos viales marcados **S** y diferenciar como **Sc**.
7. Extraer 50 mL de agua de mar del matraz **B** y filtrar para determinar el blanco. Al terminar de filtrar, lavar el filtro con 250 μL de HCl 0,5 N. Guardar el filtro sin doblar en un vial

vacío (sin 2-feniletilamina) con el lado que retuvo las partículas hacia arriba, el cual se marca según la profundidad como **Bz**.

8. Si la producción es baja ($< 1 \text{ mgC m}^{-3} \text{ h}^{-1}$), incrementar el volumen a filtrar hasta 150 mL para todos los blancos así como para todas las muestras. Anotar estos volúmenes.

Incubación in situ

1. La incubación se hace en el mar utilizando una boya a la deriva. Esta boya se encuentra sujeta a una línea de 120 m de largo con lastre, marcada con pequeños enganches para colocar los grupos de cuatro matraces (3 **L**'s y 1 **D**) a las profundidades a las cuales fueron extraídas las muestras. Este método de incubación permite que las muestras permanezcan expuestas a la misma temperatura y nivel de luz natural de la profundidad de origen (IOC, 1994). La boya debe ser visible fácilmente y recuperable; por lo tanto, debe estar equipada con algún mecanismo de localización (bandera, color llamativo, reflector de radar, etc.).
2. Mantener los matraces a resguardo de la luz hasta el momento de colocarlos en los enganches de la línea. Realizar el despliegue *in situ* de la boya de producción al amanecer. Anotar las coordenadas donde se libera el despliegue y la hora de inicio de la incubación. Incubar las muestras por un periodo de tiempo que capte una porción representativa de la energía lumínica, la cual luego se extrapola a la asimilación de un día. Esto depende del régimen lumínico del sitio (variable estacionalmente), así como de la latitud. En la estación CARIACO, el tiempo de incubación es un mínimo de 4 horas y no mayor de 5 por razones de logística. La hora de inicio entre 6:30 y 7:00 AM y la final es entre 10:30 y 11:00 AM. Este intervalo equivale a $\frac{1}{3}$ de las horas de luz en un día y también donde se recibe $\frac{1}{3}$ de la energía solar promedio diaria a la latitud de la estación (10,5° N).
3. Una vez terminado el periodo de incubación, la boya y los matraces se recuperan. Anotar las coordenadas donde se recupera el despliegue y la hora. Separar los grupos de matraces de la soga y colocarlos en cajas oscuras con tapa ó bolsas plásticas oscuras rotuladas, mantenerlos a resguardo de la luz hasta el momento de filtrar. Realizar la filtración tan pronto como sea posible para evitar cambios debido a procesos biológicos que ocurran dentro del matraz.
4. Manteniendo el laboratorio del barco bajo condiciones de luz tenue, extraer 50 mL del contenido de cada matraz (**L** y **D**) empleando una jeringa de plástico de 60 mL. Filtrar en cuatro embudos individuales a través de filtros de fibra de vidrio de 25 mm manteniendo el nivel de vacío de la bomba en 70 mm Hg ó menos. Enjuagar el filtro al final con 250 μL de HCl 0,5 N. En épocas de biomasa baja cuando se espera niveles bajos de productividad, filtrar 100 mL ó 150 mL en lugar de 50 mL. Guardar el filtro en un vial de centelleo vacío, tapar y refrigerar a 4°C hasta regresar al laboratorio. Identificar cada vial según la profundidad de origen como **Lz** y **Dz**, realizando esta operación en orden de la muestra menos profunda a la más profunda.

Análisis de las Muestras

En el laboratorio.

1. Después de desembarcar, agregar a todos los viales (**S**, **B**, **L** y **D**) 10 mL de líquido de centelleo. Realizar la operación despacio y sin producir burbujas, cuidando que la superficie del filtro quede en total contacto con el líquido. Guardar los viales resguardados de la luz y refrigerar hasta proceder a su lectura en un contador de centelleo. Nunca congelar.
2. Los viales con el líquido se miden en el contador de centelleo después de cuatro semanas ó cuando el filtro luzca completamente transparente. No agitar los viales, verificar que el filtro se encuentre totalmente transparente, y el líquido no este turbio. Limpiar los viales externamente con una servilleta que no libere pelusas y proceder a su medición.

Cálculo y Expresión de Resultados.

Los contadores de centelleo indican el número promedio de destellos de luz (o cuentas por minuto, CPM) emitidos en viales que contienen líquido de centelleo. Estos destellos se transforman en desintegraciones por minuto (DPM), ya que los equipos y el líquido no tienen una eficiencia del 100%, y no todas las desintegraciones β se captan como un destello individual. Por lo tanto, es necesario determinar la eficiencia del equipo antes de correr las muestras empleando una solución patrón DPM conocida y estable suministrada por el fabricante del equipo. Esta eficiencia es usada para corregir el resto de las mediciones. Una vez corregidos los valores se procede al cálculo de la producción (en $\text{mg C m}^{-3} \text{ h}^{-1}$) por profundidad con la siguiente fórmula:

$$\text{Producción} = \frac{[\text{DPM}(\text{Lz}) - \text{DPM}(\text{Dz})] * \left(\frac{V_{\text{am}}}{V_{\text{af}}}\right) * \text{CID} * 1,05 * F_s}{[\text{DPM}(\text{S})] * \left(\frac{V_{\text{am}}}{V_{\text{al}}}\right) * 12} \quad (1)$$

donde

DPM(Lz) = DPMs promedio por minuto de los tres filtros de las botellas transparentes (**L**) de una misma profundidad y corregidas con el blanco de los filtros (**Bo**).

DPM(Dz) = DPMs en el filtro de la botella oscura (**D**) corregida con el blanco de los filtros (**Bo**).

V_{am} = volumen de agua en el matraz (290 mL, constante en este caso).

V_{af} = volumen de agua filtrada en los matraces **L**, **D** y **B** (50, 100 ó 150 mL).

CID = concentración de carbono inorgánico en agua de mar a las profundidades de captación en mg C m^{-3} .

1,05 = constante que describe la diferencia de difusividad de las moléculas con ^{12}C y ^{14}C en las células vivas.

F_s = proporción de la energía solar diaria recibida durante la incubación. Número relativo calculado en base al área integrada bajo la curva de radiación solar entre el periodo de incubación para la latitud de la estación (**NOTA 2**).

DPM(S) = DPM de las alícuotas **Sz** del líquido extraído de los matraces **L** al inicio del experimento, o radiación añadida.

V_{al} = volumen de la alícuota (ó 0,20 mL) extraída del matraz a los viales (**Sz**).

12 = factor para el cálculo de la concentración por hora. Si este factor se ignora, la producción calculada es por día.

Referencias

- Knap, A.H.; Michaels, A. F.; Steinberg, D.; Bahr, F.; Bates, N.; Bell, S.; Countway, P.; Close, A.; Doyle, A.; Dow, R.L.; Howse, F.; Gundersen, K.; Johnson, R.; Kelly, R.; Little, R.; Orcutt, K.; Parsons, R.; Rathbun, C.; Sanderson, M.; Stone, S. (1997). BATS methods manual. Version 4. U.S. JGOFS Planning Office, Woods Hole, 136 pgs.
- Intergovernmental Oceanographic Commission (IOC). (1994). "Protocols for the Joint Global Ocean Flux Study (JGOFS) Core Measurements". Manual and Guides 29, 178 pgs. UNESCO.
- Ros, J. D. (1979) "Prácticas de ecología" Editorial Omega. Barcelona, 181 pgs.
- Stemann, Nielsen E. (1952). "The use of radio-active carbon ^{14}C for measuring organic production in the sea". *Journal due Conseil Permanent International pour l'Exploration de la Mer*, 18(2): 117-140.
- Strickland J., D., H., Parsons T., R. (1972). "A practical handbook of sea water analysis". *Fisheries Research Board of Canada*, Bulletin 167, 2nd edition, Ottawa, 310 pgs.
- Strickland, J. D. H.; Parsons, T. R. (1972). "A practical handbook of seawater analysis". *Fisheries Research Board of Canada*. Bulletin 167, 2nd edition, 310 pgs.

Apéndice 1. Preparación de la solución de trabajo de bicarbonato de sodio marcado con C^{14} ($\text{NaH}^{14}\text{CO}_3$), concentración aproximada $11 \mu\text{Ci mL}^{-1}$

La cantidad de bicarbonato marcado que se agrega a cada matraz debe tener una actividad de $4 \mu\text{Ci}$, la cual es un nivel adecuado para áreas con productividad alta ($> 1 \text{ mgC m}^{-2} \text{ d}^{-1}$) y periodos de incubación cortos (4 horas). Para obtener esta actividad se requiere preparar una solución de trabajo intermedia, entre la que suministra el fabricante (1 mCi mL^{-1}) y la actividad final que se debe agregar a cada matraz ($4 \mu\text{Ci}$). El uso de isótopos radioactivos se rige bajo una serie de regulaciones, medidas de seguridad y protocolos de disposición de residuos en el ambiente que varían según el país. Los investigadores deben conocer estos detalles y seguir su implementación. Realizar todas las operaciones de preparación relacionadas con este análisis en una bandeja que capture los derrames sobre una mesa cubierta con papel absorbente protegido con plástico por una cara. Usar guantes de vinilo en todo momento.

Materiales

Lavar todo el material de vidrio con HCl al 10% y agua destilada, envolver en papel de aluminio y esterilizar en autoclave por 5 minutos. Colocar en una estufa a $70 \text{ }^\circ\text{C}$ por 3 a 4 horas.

1. Pipetas de vidrio de 5 mL.
2. Vasos de precipitado de vidrio de 100 y 500 mL.
3. Matraz volumétrico de 100 mL.
4. Gotero.
5. Filtros de jeringa de nylon, 25 mm de diámetro y $0,2 \mu\text{m}$ tamaño de poro.
6. Jeringas de plástico de 60 mL para filtrar agua a través de los filtros.
7. Jeringas de tuberculina con su aguja.
8. Viales de suero de 15 mL, con tapa de goma.

Reactivos

1. **Solución concentrada de bicarbonato de sodio** marcado con ^{14}C ($\text{NaH}^{14}\text{CO}_3$), actividad específica 1 mCi mL^{-1} , Amersham CFA3.
2. **Agua destilada** proveniente de un destilador de vidrio.
3. **Solución de hidróxido desodio** (NaOH $0,1 \text{ N}$).
4. **Solución buffer de pH 10**.
5. **Acido clorhídrico** (HCl , $0,1 \text{ N}$).

Equipos

1. Medidor de pH.
2. Agitador magnético.
3. Balanza de $0,01 \text{ g}$ de precisión.
4. Autoclave.

Preparación de la Solución

1. **Ajuste del pH del agua destilada**
 - a. Agregar aproximadamente 250 mL de agua destilada en un vaso de precipitado, tapar.
 - b. Calibrar el medidor de pH con una solución buffer de pH 10.
 - c. Agregar gota a gota una solución de NaOH $0,1 \text{ N}$ hasta ajustar el pH del agua destilada a pH de $9,5$; agitando suavemente con el agitador magnético.
2. **Preparación de la solución de bicarbonato (concentración $9 - 11 \mu\text{Ci mL}^{-1}$)**
 - a. Tarar un matraz volumétrico de 100 mL con la tapa.
 - b. Empleando una jeringa de plástico con un filtro de nylon adherido a la punta, agregar agua destilada con pH ajustado al matraz el cual debe estar colocado sobre la balanza analítica, añadir hasta 60 mL (determinar el volumen en función del peso).
 - c. Con una jeringa de tuberculina, extraer todo el contenido de la ampolla que contiene la solución concentrada de bicarbonato y agregarlo al matraz volumétrico con el agua.
 - d. Enjuagar la ampolla tres ó cuatro veces con agua destilada filtrada con pH ajustado, empleando la jeringa de tuberculina. Agregar este enjuague en el matraz volumétrico que contiene la solución de bicarbonato.
 - e. Alcanzar en el matraz un volumen de hasta 90 mL (en forma gravimétrica) con el agua destilada de pH ajustado empleando la jeringa de 60 mL con el filtro.
 - f. Mezclar el contenido del matraz levemente.
 - g. Trasvasar la solución de trabajo a viales de suero de 15 mL empleando pipetas estériles de 5 mL . Llenar 6 envases con 15 mL cada uno. Sellar. Extraer el aire del vial con una jeringa de tuberculina.
 - h. La actividad específica de esta solución de trabajo es $11 \mu\text{Ci mL}^{-1}$ Refrigerar a $4 \text{ }^\circ\text{C}$ por no más de seis meses.
 - i. El volumen de la solución de trabajo de bicarbonato que se agrega a los matraces de incubación para asegurar una actividad de $4 \mu\text{Ci}$ se calcula a partir de las lecturas con el contador de centelleo. Este volumen tiene que ser de $420 \pm 45 \mu\text{L}$. Antes de cerrar el

último frasco, extraer 30 μL y agregarlos a un vial de centelleo que contenga 200 μL de 2-feniletilamina. Medir en el contador de centelleo la actividad real de la solución y determinar con precisión el volumen de la misma necesario para obtener una actividad de 4 μCi por dosis.

$$\text{Actividad en } \mu\text{Ci mL}^{-1} = (\text{DPM}(\text{Sc})/2200000)/0.03 \text{ mL} \quad (2)$$

Los volúmenes indicados están en función de que cada envase preparado es para usar una sola vez con un residuo mínimo. Así que 15 mL permite preparar 32 matraces de incubación. La solución en los envases pierde actividad con el tiempo si no se encuentran llenos debido a la pérdida de CO_2 .

Apéndice 2. Cálculo de F_s

Para los cálculos de la producción primaria, se puede usar un factor F que tome en cuenta no solo el tiempo de incubación, sino también la proporción de la energía solar diaria que reciben las muestras. Debido a que la incubación en CARIACO no se puede realizar por un periodo completo de luz diaria (12 horas), la cantidad de energía no es la misma a la hora de inicio de la incubación que a la hora final. Utilizando un sensor de radiación lumínica (con colector de coseno) se puede determinar la curva de radiación solar diaria proveniente del cielo (Figura 14.2). Estas curvas también se pueden calcular a partir de tablas en función de la latitud y del mes del año. El factor solar F_s es la proporción del área bajo la curva en el intervalo de las horas empleadas para la incubación en relación al área total bajo la curva. Se busca asegurar que la proporción sea como mínimo un tercio de la energía diaria y que el número de horas sea también un tercio del período de luz.

La propuesta anterior se puede obviar si no se toma en cuenta la energía luminosa sino mas bien considerando las horas de incubación usadas, para lo cual solo hay que modificar la formula (1) eliminando el factor F_s en el numerador, y sustituyendo la constante 12 en el denominador por el tiempo en horas de incubación en fracción decimal.

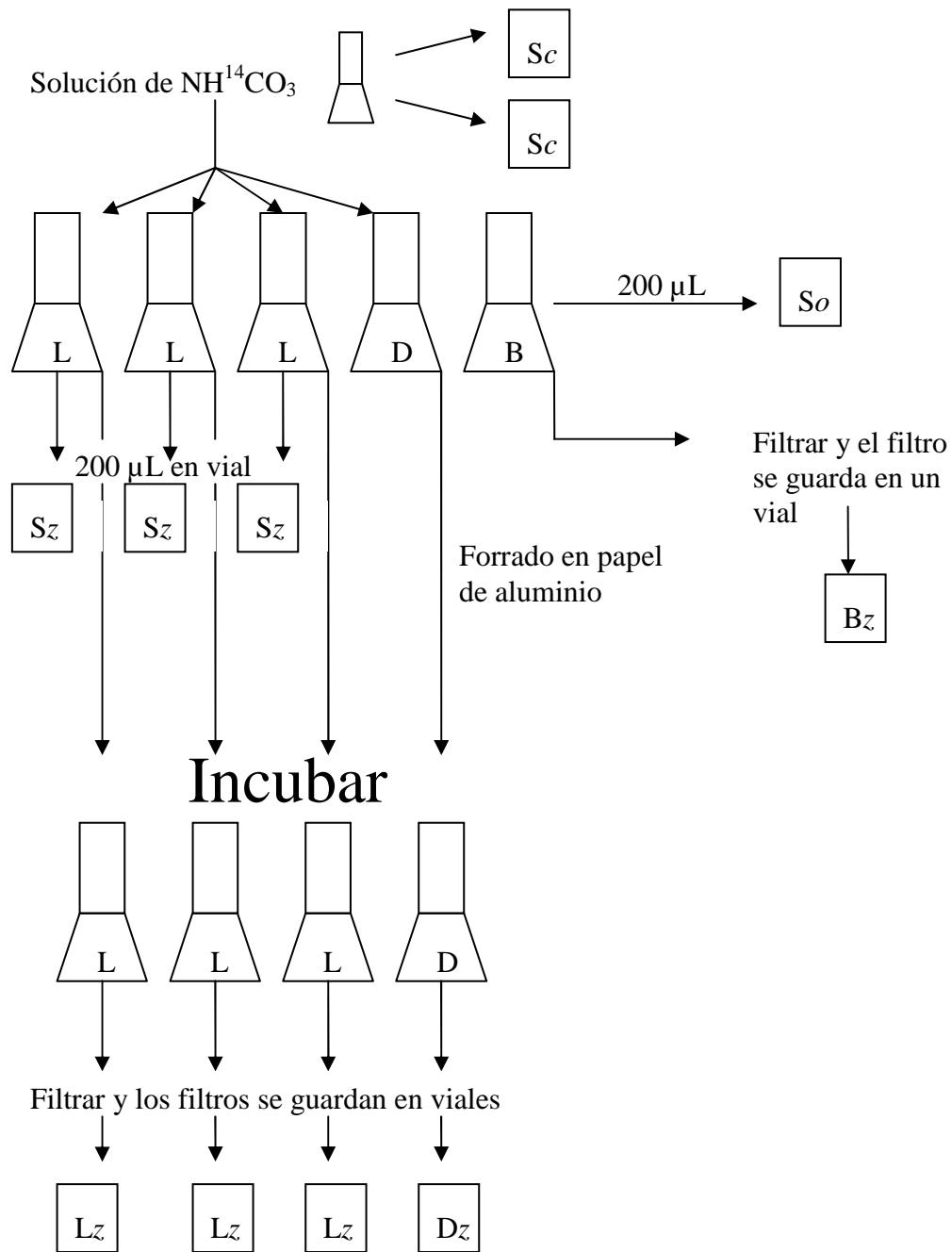


Figura 14.1. Diagrama del procedimiento a seguir durante el análisis de producción primaria. Los viales marcados con S contienen 200 μL de 2-feniletilamina.

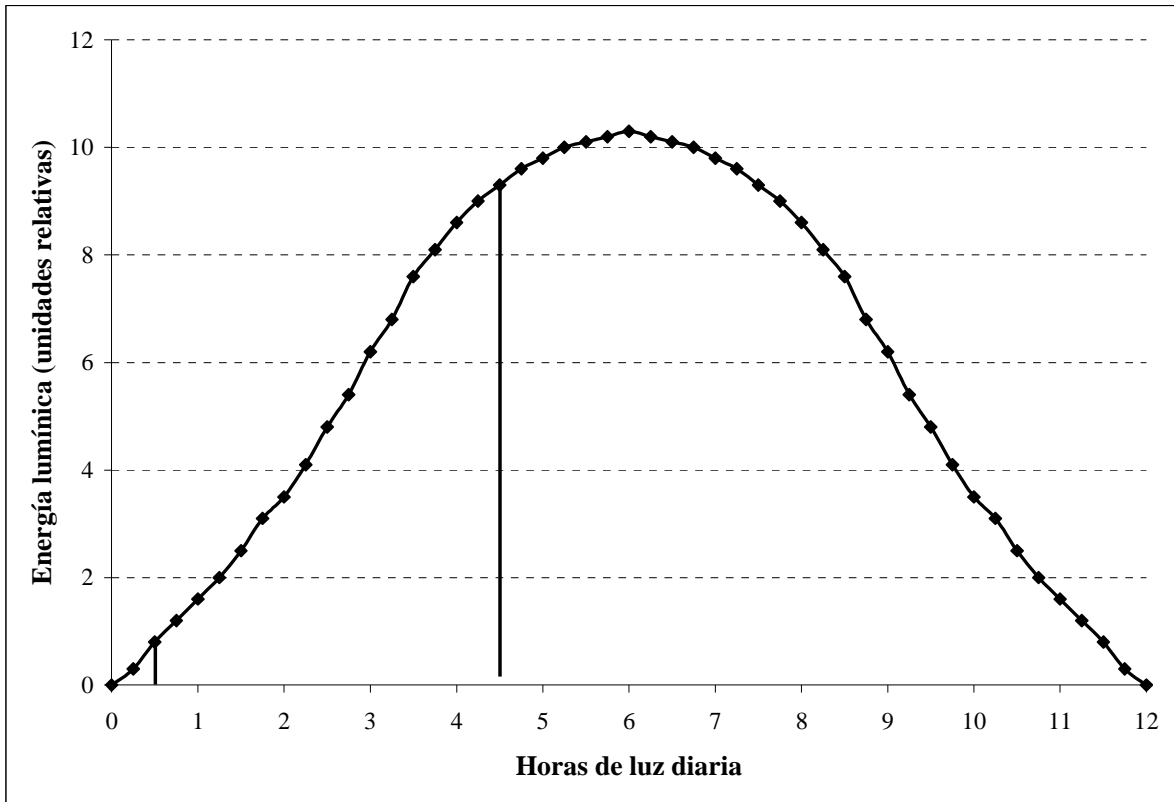


Figura 14.2. Curva de la energía solar diaria en la estación CARIACO. La línea vertical indica el periodo de incubación realizado en CARIACO.

CARIACO TIME SERIES STUDY

HANDBOOK OF METHODS FOR THE ANALYSIS OF OCEANOGRAPHIC PARAMETERS AT THE CARIACO TIME-SERIES STATION

EDITORS

**YRENE M. ASTOR
LAURA LORENZONI
MARY SCRANTON**

AUTHORS

**YRENE M. ASTOR
KENT FANNING
LAURENCIA GUZMAN
XIAONA LI
LAURA LORENZONI
ROBERT MASSERINI
FRANK MULLER-KARGER
ERIC TAPPA
RAMÓN VARELA**

2011

CONTENTS

List of Figures	3
List of Tables	4
INTRODUCTION	5
Method 1. Sampling Procedures.	7
Method 2. CTD Handling and Data Processing.	11
Method 3. Determination of Salinity.	20
Method 4. Determination of Hydrogen Sulfide	22
Method 5. Determination of Dissolved Oxygen	28
Method 6. Determination of pH	33
Method 7. Determination of Total Alkalinity	37
Method 8. Determination of Spectral Absorption Coefficients of the Particles and Phytoplankton.	41
Method 9. Determination of Colored Dissolved Organic Matter.	46
Method 10. Determination of Total and Dissolved Nitrogen and Organic Carbon.	49
Method 11. Determination of Particulate Carbon and Nitrogen.	54
Method 12. Determination of Nutrients Using Continuous Flow Analysis (CFA).	57
Method 13. Determination of Chlorophyll <i>a</i> and Phaeopigments.	75
Method 14. Determination of Primary Production.	81

List of Figures

Figura 4.1. Sampling method for H ₂ S samples.	27
Figure 12.1. Main components of a CFA system (Gordon <i>et al.</i> , 2000)	66
Figure 12.2. Scheme for the preparation of silicic acid standard.	67
Figura 12.3. Flow diagram for phosphate system (Gordon <i>et al.</i> , 2000).	68
Figure 12.4. Flow diagram for the nitrate system (Gordon <i>et al.</i> , 2000)	69
Figure 12.5. Cd-Cu column to use in an AA-II (Gordon <i>et al.</i> , 2000)	70
Figure 12.6. Flow diagram for the nitrite system (Gordon <i>et al.</i> , 2000)	71
Figure 12.7. Flow diagram for the silicate system (Gordon <i>et al.</i> , 2000)	72
Figure 12.8. Flow diagram for the ammonia system (Gordon <i>et al.</i> , 2000)	73
Figure 14.1. Diagram of the procedure to follow during primary production analysis. The vials marked with S are filled with 200 µL of 2-phenethylamine.	89
Figure 14.2. Curve of daily solar radiation at the CARIACO station. The vertical line indicates the period of incubation used in CARIACO.	90

List of Tables

Table 1.1. Variables measured in the hydrocasts of the CARIACO project.	8
Table 1.2. Sequence of sampling at the CARIACO station.	9
Table 1.3. Sequence of the casts and order of sampling.	10
Table 5.1: Density of distilled water at a temperature t °C	32
Table 12.1: Volume of standard A (or B in case of ammonia and nitrite) to prepare standard solutions C. LNSW, low nutrient seawater.	74

ACKNOWLEDGEMENTS

We wish to express our gratitude to Dr. James Swift, Director of CLIVAR and Carbon Hydrographic Data Office (CCHDO) for permission to include the flow charts from autoanalyzer published in the manual “A Suggested Protocol for Continuous Flow Automated Analysis of Seawater Nutrients” (from WOCE Hydrographic Program and the Joint Global Ocean Fluxes Study, Gordon *et al.*, 2000). We wish to thank also Euclides Rada who collaborated with us at the beginning of the manuscript.

We also wish to express our gratitude to the several financial agencies that funded the CARIACO Project throughout the years and allowed his continuous operations: Consejo Nacional de Investigaciones Cientificas y Tecnologicas (CONICIT, 96280221), Fondo Nacional de Ciencia y Tecnología (FONACIT, 2000001702) both from Venezuela. The National Science Foundation (NSF Grants OCE- 0752139, OCE-9216626, OCE-9729284, OCE-9401537, OCE-9729697, OCE-9415790, OCE-9711318, and OCE 0963028 to FMK; OCE-9415790, OCE-9711318, OCE-9730278, OCE-0118491, OCE-0326175, and OCE-0752014 to MIS and GTT; OCE-0752037 and OCE-1039503 to RT) and the National Aeronautics and Space Administration (NASA): NAG5-6448 y NAS5-97128.

We dedicate this manual to Dr. Pablo Mandazen (Hermano Gines) for his confidence in our activities.

INTRODUCTION

Frank Muller-Karger

The CARIACO (CARbon Retention In A Colored Ocean) oceanographic time series program focuses on collecting a comprehensive set of oceanographic observations at the CARIACO Station (10°30'N, 64°40'W), in the deepest portion of the eastern half of the Cariaco Basin, off the coast of Venezuela. The CARIACO program was established in 1995 to function as a time series facility that produces timely, high-quality oceanographic data. A key objective of this effort is to serve the international ocean carbon and biogeochemistry (OCB) and paleoclimate research communities by maintaining a long-term ecosystem observing facility in the Cariaco Basin.

CARIACO is one of the three ocean biogeochemistry time series stations established around the world with support from the National Science Foundation (NSF) and of local governments and institutions. The other two are A Long-term Oligotrophic Habitat Assessment (ALOHA; 22°45'N, 158°00'W) and the Bermuda Atlantic Time-series Study (BATS; 31°45'N, 64°10'W). While ALOHA and BATS serve as facilities to study change in the North Pacific and North Atlantic Ocean, respectively, the CARIACO time series is located in a continental margin setting. The Cariaco Basin exhibits about twice the primary production and vertical particulate organic matter flux observed at oligotrophic locations. CARIACO also provides an opportunity to study biogeochemical and ecosystem processes in the euphotic and twilight zones along an oxic/anoxic gradient.

Monthly cruises have been conducted since October 1995 to collect a set of core observations in both oxic and anoxic waters at the CARIACO Station to measure temporal variability and trends that span seasonal, interannual and interdecadal time scales. The time series addresses the scientific objective of understanding the relationship between hydrography, community composition, primary production, microbial activity, terrigenous inputs, sediment fluxes and biogeochemical cycles in the water column, and how changes in these processes are preserved in seafloor sediments.

The CARIACO ocean time series owes its success to a number of factors. The understanding that a good observation, a good datum is critical to conduct science is of primary importance. The scientists, technical staff and students engaged in collecting observations within the framework of the CARIACO program are dedicated to continuously monitoring the quality of the data collected, and to revising methods and techniques to ensure the highest standards are met for every observation collected.

Another key factor is the strong collaboration established between participating scientists. The three U.S. universities (University of South Florida, University of South Carolina, Stony Brook University) and four Venezuelan institutions (Fundación La Salle, Univ. Simón Bolívar, Univ. de Oriente, and the Centro de Procesamiento de Imágenes) involved in collecting the core CARIACO observations have tight research and administrative links that enable frequent, rapid and effective communications, transfer of samples and data, technical assistance, and funds as required.

Another key to success is making all data openly available as soon as the number is deemed to be of high quality and useful to conduct science. Basic hydrographic, biological, and chemical data

collected under the CARIACO program are routinely delivered to the National Oceanographic Data Center (NODC-NOAA) and to NASA's SeaBASS database. We also collaborate with and fully support the Ocean Carbon and Biogeochemistry Data Management Office (OCB DMO <http://ocb.who.edu/cariaco.html>; PI: D. Glover/WHOI), funded by the NSF. All data are made available for public use through the Internet portals <http://cariaco.ws> (Universidad Simón Bolívar, Venezuela) and <http://imars.usf.edu/cariaco/index.html>.

Local support is also critical to establish and maintain the time series program. The CARIACO program benefits from significant logistical elements, infrastructure, interest and support in Venezuela. Fundación la Salle de Ciencias Naturales (FLASA) has served as the principal base for all field operations and is the interinstitutional hub in Venezuela. FLASA administrators and scientists have assisted in all aspects of our work.

The CARIACO program is also known and is respected for its scientific leadership in Central and South America. It has served as a model for other national ocean observing programs in the region. In September 2006, the CARIACO program was recognized at the Headquarters of the Venezuelan Navy by the Intergovernmental Oceanographic Commission (IOC-UNESCO/IOCARIBE) for its excellence in research and contribution to scientific development in marine science in the region.

This manual was written by scientists and technicians engaged in CARIACO to document the methods used to collect the core of select observations that constitute the time series program. The manual explains the methods in both English and Spanish to make them accessible to scientists and technical personnel interested in the CARIACO data and in the operation of the facility, and to those who are interested in implementing similar measurement programs. This manual is one of the outcomes of the strong educational efforts conducted by the CARIACO program to train scientific personnel and students in the collection and analysis of high-quality observations. The effort to develop the manual was inspired in the US JGOFS BATS methods manual (UNESCO, 1994), and includes modifications and new methods now used in the CARIACO program.

References

UNESCO. (1994). Protocols for the Joint Global Ocean Flux Study (JGOFS) Core Measurements. IOC Manuals and Guides No. 29. UNESCO. Paris. P. 128-140.

Method 1. Sampling Procedures

Yrene M. Astor

Introduction

The Cariaco time series station is located at 10°30'N and 64°40'W. The frequency of sampling is monthly and each oceanographic cruise lasts 24 hours. Core measurements require four separate hydrographic casts using a rosette equipped with a CTD, of 12 bottles with a capacity of 8 L. Moreover, radiometric measurements, zooplankton tows and measurements with an Acoustic Doppler Current Profiler (ADCP) are also made. Table 1.1 shows the parameters that are measured in each cruise, and Table 1.2 indicates the sequence of the activities on board during a cruise.

The chief scientist coordinates the logistics of each oceanographic cruise, controls sampling and the successful implementation of the sequence and sampling protocols. Prior to sampling, the chief scientist informs the participants on the cruise of the tasks to perform and reviews with the staff the methods of collecting samples and the appropriate preservation for each parameter. Instructions indicating sampling protocol, preservation methods for each parameter and precautions to follow are placed in visible areas around the rosette and in the laboratories of the boat for possible consultations. The specific protocol of the cruise that indicates the sequence of the casts, parameters to measure and the persons responsible for sampling are also placed in work areas.

Hydrocasts

Measuring and sampling the basic variables at the time series station requires of four hydrocasts: calibration, primary production, inter-deep and shallow. Each cast is done with a 12 bottle rosette system (SeaBird, model SBE 32), and this system is equipped with a CTD (SeaBird, model SBE 25). A summary of the sequence of the hydrocasts, depths to which the bottles are closed, as well as the order in which samples are taken are specified in Table 1.3. Once the CTD-rosette system is on board, it is washed with fresh water and the collection of different samples are carried out immediately.

Table 1.1. Variables measured in the hydrocasts of the CARIACO project.

PARAMETER	UNITS	REFERENCES
Temperature	°C	SeaBird SBE 3F (6800 m)
Salinity		SeaBird SBE 4C (6800 m)
Pressure	db	SeaBird SBE 29 (2000 m)
Fluorescence	mgCl <i>a</i> m ⁻³	WETlabs ECO-FLRTD
Dissolved oxygen	mL L ⁻¹	SeaBird SBE 43
Beam attenuation coefficient	m ⁻¹	WETLabs C-star
Discrete salinity		Guildline Portasal [®]
Discrete dissolved oxygen	μM	Aminot and Chaussepied (1993)
pH		Clayton and Byrne (1993)
Hydrogen sulfide	μM	Cline (1969)
Total alkalinity	μmol kg ⁻¹	Breland and Byrne (1993)
Nutrients	μM	Gordon <i>et al.</i> (2000)
Particulate organic carbon and nitrogen	μg L ⁻¹	Sharp (1974)
Chlorophyll <i>a</i>	mgCl <i>a</i> m ⁻³	Holm-Hansen <i>et al.</i> (1965)
Phytoplankton	Cells mL ⁻¹	Several references
Primary production	mgC m ⁻³ h ⁻¹	JGOFS (1994)
Colored dissolved organic matter	m ⁻¹	Bricaud <i>et al.</i> (1981)
Particle absorption	m ⁻¹	Kishino <i>et al.</i> (1985)
Total and dissolved organic carbon/Total and dissolved nitrogen	μM	Dickson <i>et al.</i> (2007)

Table 1.2. Sequence of sampling at the CARIACO station.

Sampling type	Hour	Depth (m)
Calibration cast	4:00	200
Primary production cast	4:30	100
<i>In situ</i> production buoy deployment	~ 7:00	
Inter-deep cast	7:00	1310
Zooplankton tow	9:00	200
Recovery of production buoy	4 hours before deployment	
Radiometric measurements	11:30	100
ADCP cast	12:30	400
Shallow cast	13:00	160

Table 1.3. Sequence of the casts and order of sampling.

DEPTHS (m)	1	7	15	25	mchl	35	55	75	100	130	160	200	250	In	300	350	400	500	750	1310
4:15 <i>Calibration</i>	Continuous cast without collecting samples																			
4:30 <i>Primary Production</i>																				
Primary Production	x	x	x	x	x	x	x	x	x											
Particle absorption	x	x	x	x	x															
Phytoplankton taxonomy	x	x	x	x	x	x	x	x	x											
Chlorophyll and pheopigments	xx	xx	xx	xx	xx	xx	xx	xx	xx											
HPLC	x	x	x	x	x	x	x	x	x											
7:00 <i>Intermediate-deep</i>																				
Dissolved oxygen													xx	xx	xx	xx	xx	xx		
pH													xx	x	xx	x	x	x	x	xx
Total organic carbon													x		x				x	x
Dissolved organic carbon													x		x					
Particulate organic carbon and nitrogen													x	x	x	x	x	x	x	x
Bacteria													x	x	x	x	x	x	x	x
Salinity													x	x	xx	x	x	x	x	xx
Total alkalinity													x	x	x	x	x	x	x	x
Nutrients													x	x	x	x	x	x	x	x
13:30 <i>Shallow</i>																				
Dissolved oxygen	xx	xx	xx	xx		xx	xx	xx	xx	xx	xx									
pH	xx	x	x	x		xx	x	x	x	xx	x									
Colored dissolved organic matter	x	x	x	x																
Total organic carbon	x					x		x		x										
Dissolved organic carbon	x					x		x		x										
Particulate organic carbon and nitrogen	x	x	x	x		x	x	x	x	x	x									
Bacteria		x		x		x	x	x	x	x	x									
Salinity	x	x	x	x		x	x	x	x	x	xx									
Total alkalinity	x	x	x	x		x	x	x	x	x	x									
Nutrients	x	x	x	x		x	x	x	x	x	x									
mchl = chlorophyll_a maximum x = number of replicates for each depth IN = interface, limit between the oxic and the anoxic layer																				

Method 2. CTD Handling and Data Processing

Yrene M. Astor y Ramón Varela

Introduction

The following describes the core measurements and data processing activities being undertaken to obtain the CTD continuous profiles of basic parameters such as temperature, pressure and conductivity, and additional parameters such as fluorescence, dissolved oxygen, and light beam attenuation coefficient. The instrument **package** (CTD and rosette) makes oceanographic casts in real time, meaning that the values are read and recorded simultaneously as the cast takes place. The sensors that are part of the **package** convert environmental data in measurements of voltage or frequency. Based on these variables, salinity, depth, density, etc., can be derived. This chapter describes the type of equipment that is being used at the Cariaco station, its operation and the method employed to process data based on the recommendations of Sea-Bird Electronics (2008). All software is available directly from SeaBird (www.seabird.com).

Equipment

The instrument **package** used at the CARIACO Time Series Station consists of a SeaBird SEALOGGER SBE 25 (instrument for measuring conductivity, temperature and depth), a carousel or rosette (model SBE 32) and a deck unit (model SBE 33). The CTD records at a sampling rate of 8 Hz and has channels for seven auxiliary sensors. The carousel is an electro-mechanical device that triggers the closure of bottles and collection of samples, and is equipped with 12 Niskin bottles. The deck unit supplies energy that controls the carousel and allows the display of data in real time.

Sensors

The CTD includes the following sensors:

Pressure. SeaBird Electronics, model SBE 29; depth range: 2000 m; accuracy: 0.1% of full scale.

Temperature. SeaBird Electronics, model SBE 3F; range from -5 to 35 °C; accuracy: 0.002 °C; resolution: 0.0003 °C; response time: 0.07 s; stability: 0.002 °C yr⁻¹; depth range: 2000 m.

Conductivity. SeaBird Electronics, model SBE 4; range: 0 to 7 S m⁻¹; accuracy: 0.0003 S m⁻¹; resolution: 0.00004 S m⁻¹; response time: 0.06 s with pump; stability: 0.0003 S m⁻¹ month⁻¹; depth range: 2000 m.

Dissolved oxygen. SeaBird Electronics, model SBE 43; range: 120% saturation level on the surface; accuracy: 2% saturation; stability: 2% in the first 1000 hours with a clean membrane; depth range: 2000 m.

Light transmission. WETlab, model C-Star; path length: 25 cm; response time: 0.167 s; sensitivity: 1.25 mV; wavelength 660 nm; band width: ~ 20 nm; depth range: 6000 m.

Fluorescence. WETlab, model ECO-FLRTD; range: 0.01 to 125 µg L⁻¹; sensitivity: 0.01 µg L⁻¹; linearity: 99% R²; Excitation/Emission: 470/695 nm; depth range 6000 m.

Most of these sensors require a constant flow of water to perform the measurements. A *pump* (SeaBird Electronics, model 5T, 2000 rpm) controls the flow. All sensors are placed in a cage attached below the structure of the carousel bottles. Each sensor is connected and set into the cage of the CTD with a specific configuration to obtain precise measurements of water characteristics. SeaBird Electronics provides different settings diagrams for different applications (<http://www.seabird.com>). The pressure, temperature, conductivity and dissolved oxygen sensors are sent to the manufacturer once a year for maintenance and calibration.

CTD Operation

Once on board and before sailing, test the instrument **package** (CTD and carousel) to verify communication with the CTD, recording of data and bottle triggering. Upon arrival at the station, prepare the CTD for deployment. First, establish communication with the instrument using the program *Seaterm*, verify the status of the instrument, and initialize logging. With the *Seasave* program, prepare the display and format in real time for data storage. All these programs come in the Seasoft package (<http://www.seabird.com>). Turn on the CTD just before beginning the cast. Lower the instrument **package** to a depth of 7 m and maintain at that level for 5 minutes to equilibrate the sensors. This period of stabilization is necessary so the whole package comes to the surface water temperature, the conductivity cell wets with seawater, the pump is allowed to come on, and sensors and instrument operation can be confirmed (SeaBird Electronics, 2008). Once completed, bring the instrument **package** close to the surface and begin the cast. Before initiating the deployment, stop data acquisition and restart, saving the file with the same name, in order to eliminate the data recorded during the period of stabilization. These data are erratic and inaccurate and are usually removed during data processing.

Lower the instrument **package** at a speed of 0.75 to 1 m s⁻¹ until the desired depth is reached. Verify real-time operation of the sensors with the program *Seasave*. During the downcast, identify the depths at which water collection is desired. Apart from the pre-established depths for Cariaco (see **Method 1**), other interesting ones are the depth of chlorophyll maximum, the depth of the oxic-anoxic interface, etc. Samples are collected during the upcast. The instrument **package** is held for 2 minutes at each depth before closing each bottle to ensure flushing of the bottle and sensor stabilization. The turbulence that is created during the upcast can have an impact on the water collected; therefore, it is advised to wait a reasonable amount of time before closing the bottles. The water conditions at the moment of bottle closure are recorded by the CTD and the information stored in a file with the extension **.BL**.

The data from each cast is recorded directly into the ship's computer in real time. For each cast, register the file name, time, and GPS position of the ship. Keep a record of the problems that occur while making the cast and any other relevant information about the weather or water conditions. At the end of each cast, the program *Seasave* produces three files with the following extensions:

- **.HEX**. Representation of the profile information as binary data in hexadecimal format together with a header.
- **.CON**. Contains the configuration of the instrument and calibration coefficients used by the program.

- **.BL**. Stores the information on water conditions at the time of closing each bottle.

Equipment Maintenance

Before the cruise

1. Check the CTD batteries.
2. The conductivity cell is very sensitive to material deposited in the electrodes and cell. The electrodes are prone to get dirty, and bacterial growth can be another source of impurities. All of this leads to a change in the dimensions of the cell. Wash the cell with a non-ionic detergent (Triton-X) before each cruise.

During the cruise

1. After each cast and when the instrument **package** is on board, turn it off and wash with tap water to remove seawater on electronic instruments, specially rinse the conductivity cell, the bottle triggers and the light transmission and fluorescence meter windows. At the end of the cruise, wash the whole with soap and water.

After the cruise

1. Lubricate the connections of the instrument with a light layer of silicone grease, which acts as a lubricant and sealant. Avoid lubricants that break the adhesion between nuts and bolts.
2. Check occasionally sacrificial anodes made of zinc.
3. Over time, springs and rubber seals on the bottles are weakened, allowing exchange between the sample that is captured and the surrounding water. Examine these parts regularly and repair any leaks or replace any damaged material.
4. Regularly verify that the hose that connects the water pump with sensors is free of debris, garbage and dirt to ensure a smooth flow of water.

Data Processing

Data processing for each cruise consists of converting the raw data in scientific units from which variables of interest are calculated, and reduce the size of data matrices to a more manageable scale. Process the data using the software package *SBEDataProcessing-Win32* (SeaBird Electronics, Inc.). The steps to be taken for processing data from the CTD model SEALOGGER SBE 25 are as followed:

Stage 1 processing

1. **First step**. Transform the CTD raw data (.HEX file) into scientific units (.CNV file) using the *Data Conversion* module. This module creates a file with the extension .CNV containing the processed data. Graph the data using the module *Seaplot* to check for the presence of values that differ from the average by more than a specific number of standard deviations. Remove outliers using the module *Wildedit* as many times as necessary. In

- parallel, the *Data Conversion* module creates a file extension .ROS from the file. BL, which contains information on water conditions at the time of bottle closure.
2. ***Determination of advanced coefficients in seconds with respect to pressure.*** The CTD sensors are not aligned physically in the instrument **package**. Factors such as the pumping speed, tubing setup, transfer time of water through the tubing, and rocking of the boat generate records that do not correspond to the same parcel of water (SeaBird Electronics, 2008). Use the *Align CTD* module to correct this. This module aligns the data with respect to pressure and ensures that they characterize the same parcel of water. This module uses different coefficients for each variable, and these coefficients are chosen before starting ***stage 2 of data processing***. For example, the advance of the signal with respect to pressure for the oxygen sensor varies between 3 and 7 seconds. To choose the most adequate time period, run the module *Align CTD* to the processed CTD file (.CNV file) from the calibration cast using a range of possible advances creating a separate file for each one. Graph the oxygen data for each test using the module *Seaplot* and choose the value in seconds that minimizes the difference between the downcast and the upcast. The value chosen applies to all files obtained during this cruise when running the module *Align CTD* under ***stage 2 of processing***. This procedure also applies to the light transmission and fluorescence meter data.

Stage 2 processing

1. Once the correct alignment values are established, run the *Filter* module with the processed data (.CNV file). This module 'softens' high frequency data. SeaBird provide the time constants for each variable according to the model of the equipment. For the SBE 25, SeaBird recommends use of a low pass filter with a time constant of 0.5 s for pressure and a time constant of 0.03 s with conductivity.
2. Run the module *Align CTD*. For the SBE 25 with a standard pump of 2000 rpm, SeaBird recommends an advanced conductivity coefficient with respect to temperature of + 0.1 s. The appropriate values for dissolved oxygen sensor, fluorescence and light transmission are determined as described in paragraph 2 of ***Stage 1 processing***. There is no need to align temperature when using the CTD SBE 25.
3. In areas with strong temperature gradients, it is necessary to remove the effects that the conductivity cell thermal mass has on the measured conductivity, to minimize the difference between the downcast and the upcast. For that purpose, use the module *Cell Thermal Mass*. The typical values recommended by SeaBird for thermal anomaly amplitude (alpha) and thermal anomaly time constant (1/beta) for SBE 25 are 0.04 and 8, respectively.
4. Run the *Loop Edit* module to remove the data recorded when the CTD drops/rises below a minimum speed (0.25 m s^{-1}) or when the pressure sensor shows an inverse movement with respect to the direction of the cast due to rocking of the boat.
5. Calculate dissolved oxygen in ml L^{-1} and $\mu\text{mol kg}^{-1}$ using the *Derive* module.
6. Average data with the module *Bin Average* specifying the type of parameter to average (pressure, depth, time or scan number) and the desired range for interval.
7. Calculate parameters such as salinity, sigma-t, potential density, potential temperature, oxygen saturation, etc., using the *Derive* module.

8. Calculate buoyancy (Brunt-Väisälä frequency, N) and stability (E) with module *Buoyancy*.
9. Separate the file into downcast and upcast using the module *Split*.
10. The *Bottle Summary* module reads the file .ROS that is created by *Data Conversion* module and writes a summary of the data in a file .BTL. This file specifies what the water conditions were at the time of closing the bottles. The file .BTL includes the number and position of the bottle, date/time, and all variables selected.

Stage 3 processing

The following corrections are taken from instructions provided by SeaBird Electronics (2008).

1. ***Correction of salinity with discrete samples.*** During the upcast, take samples for discrete salinity measurements. These are used to calibrate the salinity derived from the CTD conductivity sensor readings. The correction is made as follows:
 - a. Examine the processed data obtained during ***Stage 2 processing*** and choose a section of the profile where the values of salinity remain constant.
 - b. Within this section, select two depths. From the .BTL files, extract pressure, temperature, conductivity, and salinity of these two depths and put these data into a spreadsheet. Include in a separate column the discrete salinity values for these two depths.
 - c. Calculate the conductivity of the discrete sample of the two depths using the module *SeacalcW*.
 - d. Calculate the slope between the two depths with the following equation:

$$m = \frac{(A * B) + (C * D)}{(A * A) + (C * C)} \quad (1)$$

where

A = conductivity of the CTD at depth X.

B = conductivity of the discrete sample at depth X.

C = conductivity of the CTD at depth Y.

D = conductivity of the discrete sample at depth Y.

- e. Introduce this new **m** value in the conductivity coefficients of a new calibration file (.CON) for the cruise, saving the file with a different name. Repeat ***Stages 1 (First step) and 2*** using the new calibration file.
 - f. Verify the validity of the correction, by making a graph of the salinity data of the downcast, before and after the correction, along with the discrete salinities of the sample and compare the salinities. If the difference between the corrected data and discrete salinity decreases with respect to the difference between the uncorrected data and the discrete salinity, the correction is valid.
2. ***Correction of dissolved oxygen with discrete samples.*** As with salinity, a series of discrete dissolved oxygen samples are collected in the oxygenated layer during the upcast and are

used to calibrate the data calculated from the records of the oxygen voltage sensor. The correction is made as follows:

- a. From the .BTL files, extract pressure, depth, temperature, SBE 43 voltage, and oxygen saturation in ml L⁻¹ of the depths where discrete samples were collected in the casts, and put these data into a spreadsheet. Include in a separate column the discrete dissolved oxygen values obtained with Winkler titration.
- b. Calculate **TcorT** with the following formula:

$$\mathbf{TcorT} = Tcor * T \quad (2)$$

where

Tcor = Tcor coefficient found in the calibration file.

T = water temperature (°C) for each depth.

- c. Raise the estimated value **TcorT** to the exponential ($e^{\mathbf{TcorT}}$).
- d. Calculate **PcorP** with the following formula:

$$\mathbf{PcorP} = Pcor * P \quad (3)$$

where

Pcor = Pcor coefficient found in the calibration file.

P = pressure (db).

- e. Raise the estimated value **PcorP** to the exponential ($e^{\mathbf{PcorP}}$).
- f. Calculate Phi with the following formula:

$$\mathbf{Phi} = e^{\mathbf{TcorT}} * \mathbf{OxiSat}(T,S) * e^{\mathbf{PcorP}} \quad (4)$$

where

$\mathbf{OxiSat}(T, S)$ = saturation level (in ml L⁻¹) to the temperature and salinity at which the sample was captured.

- g. Make a graph O₂Winkler/Phi versus voltage of SBE 43 sensor.
- h. Calculate the linear regression of the data.
- i. The calibration coefficient **Soc** for the oxygen sensor is equal to the slope of the graph, and the **Voffset** ratio is equal to the constant of the linear regression divided by the slope of the curve.
- j. Introduce these two new factors in the oxygen coefficients of a new calibration file (.CON) for the cruise and repeat *Stages 1 (First step) and 2* using the new calibration file.
- k. Verify the validity of the correction calculating the difference between the CTD uncorrected dissolved oxygen values and discrete values obtained with Winkler titrations, and the differences between the CTD corrected dissolved oxygen values and the discrete values.
- l. Make a graph of these differences against discrete values. Examine whether the correction reduces the difference between the CTD data and the discrete values.

- m. Make a graph of the CTD uncorrected dissolved oxygen data along with the corrected ones and the discrete samples. Examine whether the corrected data agrees with the discrete samples.
3. **Correction of light transmission data.** This sensor measures both light transmission (%T) and beam attenuation coefficient (c). Calibration should be carried out in air shortly before the cruise, preferably in a laboratory under stable conditions. Once the calibration is completed, calculate the new coefficients and change them in the calibration file (.CON). This allows having a real-time value adjusted for the sensor that does not require a later correction.

For calibration, follow the instructions provided by SeaBird in its Application Note No. 7, March 2004. The values are:

$$\text{Light transmission (\%)} = (M * \text{Voltage output}) + B \quad (5)$$

$$\text{Attenuation coefficient (c)} = (1/z) * \ln(T) \quad (6)$$

where

M, B = calibration coefficients.

z = path length of light beam in meters (0.25 m Wet Labs model C-tar).

T = light transmission (in decimals) which is the transmission in percentage divided by 100.

- a. **Calculation of M and B.** Connect the CTD to a computer and with the *Seaterm* program choose the configuration option SBE 25. Without turning on the CTD, activate commands >ds to awaken the CTD and >vr to turn on the sensors. The display generates a list of voltages of each sensor separated by columns. Block the path of light with a piece of black felt to find out which column corresponds to the light transmission sensor. The voltage values that tend towards zero are those belonging to this sensor. Clean light transmission sensor windows to eliminate any stain or coating. Rub the window slightly with lens paper moistened with distilled water, free from any impurity or dust, and dry with a new lens paper. Do not rub strongly on the windows. Repeat this operation about three times or until the voltage on the screen reaches a maximum value. Write down this voltage as "A1". Proceed to block the light beam with a black felt on the side window of the sensor. Write down the voltage measured as "Y1".

The calculations to determine M and B as indicated by SeaBird are:

$$M = \left(\frac{(T_w)}{(W0 - Y0)} \right) * \left(\frac{(A0 - Y0)}{(A1 - Y1)} \right) \quad (7)$$

$$B = - M * Y1 \quad (8)$$

where

A0 = output voltage in air, supplied in the calibration certificate.

Y0 = output voltage in darkness or zero (light path blocked) provided in the calibration certificate.

W0 = output voltage in pure water supplied in the calibration certificate.
 T_w = percent transmission in pure water, relative to water (100%, the estimated value provides attenuation coefficient, c_p, due to particles) or to air (90.2% using this percentage the attenuation coefficient calculated is c which is equivalent to the attenuation due to water and particles).
 A1 = voltage measured when adjusting the calibration in air.
 Y1 = voltage measured when adjusting the calibration during the light path blocking.

Change the coefficients M and B in the calibration file (.CON) using the *Seasave* program.

NOTE. In Cariaco, the value estimated is the beam attenuation coefficient caused by particles or water, c_p (660), T_w = 100. For the beam attenuation coefficient caused by particles and water (c), the constant c_w = 0.364 m⁻¹ is added to c_p (Bishop, 1986).

This adjustment is performed to correct the drift of the equipment. If the amplitude of the adjustment is too wide, it indicates a strong drift or appropriate adjustment is not reached after several attempts. Send the equipment to the manufacturer for a checkout and calibration. Verify the equipment performance during its operation when measuring the transmission of light in deep ocean waters (> 1000 m) virtually free of particles. In this case, the light attenuation coefficient should be close to pure water c_w = 0.364 m⁻¹. At the Cariaco station, the particle minimum is found at 500 m deep.

4. **Correction of fluorometer data.** The goal to measure the *in situ* fluorescence (F) is to determine the distribution of phytoplankton in the water column. The level of **F** varies considerably in direct relation to the amount of chlorophyll present in response to environmental conditions, taxonomic composition and cells physiological conditions. **F** is expressed in output voltage units of the equipment or in relative units. Only when there is a calibration between *in situ* chlorophyll (Chl *a*) samples and measurements of **F** it is possible to report corrected **F** in chlorophyll units of mg m⁻³ or µg L⁻¹. It is important to perform this calibration with samples collected at different depths as the relationship between Chl *a* and **F** varies along the water column (Rueda, 2000). Note that the data generated by the fluorometer during CTD processing are expressed in units equivalent to mg m⁻³ of chlorophyll because this is specified in the CTD configuration file. This does not mean this is correct.

Adjustment

The adjustment is derived from the expression:

$$\text{Chl } a = \frac{F}{(m * z + b)} \quad (9)$$

where

Chl *a* = chlorophyll concentration estimated from the fluorescence.

F = *in situ* fluorescence equivalent to mg m⁻³ of chlorophyll.

- z = depth (m)
- m = linear regression line slope.
- b = linear regression constant.

The steps to follow are:

- a. Extract the value of **F** from the .BTL file at the same depths at which discrete Chl *a* samples were taken (eight depths in the case of CARIACO).
- b. Calculate the relationship **F**/Chl *a* for each discrete depth.
- c. Make a graph with the value of the relationship **F**/Chl *a* versus depth. Calculate the correlation and linear regression of this set of data. The correlation can be strong or weak, as well as the sign of regression can be positive or negative.
- d. Using a spreadsheet, copy the columns with the values of depth and the value of **F** from the .CNV file. Calculate the corrected **F** (**F_{corr}**) in a third column.

$$F_{\text{corr}} = \frac{F}{(m * z + b)} \quad (10)$$

- e. Make a graph with the **F** uncorrected data, along with **F_{corr}** and discrete samples. Examine whether the corrected data coincide with the discrete samples. In most cases, the adjustment is acceptable.

References

- Bishop, J. K. (1986). The correction and suspended particulate matter calibration of Sea Tech transmissometer data. *Deep Sea Research Part A*. Oceanographic Research Papers, Volume 33 (1): 121-134.
- Rueda, D. (2000). “Variabilidad temporal de la distribución vertical de la biomasa fitoplanctónica de la depresión Oriental de la Cuenca de Cariaco y sus relaciones con los aspectos hidrográficos del estrato superficial mezclado (1996-1998)”. Tesis de Magíster Scientarium, Universidad de Oriente. Cumaná, 133 pgs.
- SeaBird Electronics, Inc. (2008). Training materials for downloading. <<http://www.seabird.com/training/TrainingHandouts.htm>> [14/abr/2008].

Method 3. Determination of Salinity

Yrene M. Astor

Introduction

This procedure describes the method for the determination of salinity in seawater within the range of 0.004 to 76 mS cm⁻¹ (salinity 2 – 42).

Principle of Analysis

The Practical Salinity Scale 1978 (PSS 78) defines the salinity of seawater as the conductivity ratio (K_{15}) between a seawater sample at a temperature of 15 °C and pressure of 1 atm to that of a KCl solution with a mass fraction of 32.4356 g kg⁻¹ of solution at the same temperature and pressure (Lewis and Perkins, 1981). A salinometer is used to measure this conductivity relationship at a constant temperature. This instrument compares constantly the seawater sample conductance against an internal reference, which is standardized against the IAPSO standard seawater.

Interferences

1. Conductivity is a measurement of the mobility of the ions to carry a charge through a solution. Since conductivity is affected by temperature, all measurements should be made at a constant temperature. When temperature rises, the thermal movement of ions increases, and therefore conductivity increases.

Materials

1. Transparent glass bottles, 250 ml capacity, with plastic screw cap and liner. Bottles are kept with water from previous sampling to prevent the salt crystal buildup due to evaporation and to maintain equilibrium with the glass (Knap *et al.*, 1997). Every six months, acid wash the bottles (10% HCl) and rinse with distilled water.

Equipment

1. Salinometer Guildline, Portasal[®] model 8410A. Range: 0.004 to 76 mS cm⁻¹ with a resolution of ± 0.0003 mS cm⁻¹ ($S = 35$ and 15 °C). Accuracy ± 0.003 units of practical salinity.

Reagents

1. *Standard Seawater IAPSO* for calibration of the instrument.

Sampling

1. Discard the water remaining in the bottle and rinse three times with the new sample. Fill up to the bottleneck, and dry the mouth and the lid with a paper towel before closing. Collect one or two replicates in each cast.
2. Keep the bottles at room temperature away from the light and in an upright position. Sample analysis must be made no later than one month after the cruise.

Sample Analysis

1. The salinometer is calibrated according to manufacturer's recommendations (Guildline Instruments, 2006) using standard seawater IAPSO. A standard solution is used to calibrate the equipment at the beginning of the analysis, and a second calibration is done at the end to check the drift of the apparatus.
2. Samples are open only at the time of analysis.
3. Shake the bottle gently to eliminate any gradient present in the bottle before opening. Three measurements are made for each sample.

Calculation and Expression of Results

The salinity calculations are based on the definition of Practical Salinity Scale (Lewis and Perkins, 1981; Unesco, 1981).

Quality Control

A graph of the results is made against depth and values are compared with average salinities $\pm 2\sigma$ for each depth calculated from the discrete samples of the Time Series data from the last three years. In addition, the data is matched with the salinity CTD data to identify outliers. Duplicate samples from deep water ($Z = 1310$ m) agree ± 0.003 units of salinity from cruise to cruise.

References

- Guildline Instruments. (2006). Technical Manual for 'Portasal' Laboratory Salinometer Model 8410, 84 pgs.
- Knap, A.H., A. F. Michaels, D. Steinberg, F. Bahr, N. Bates, S. Bell, P. Countway, A. Close, A. Doyle, R.L. Dow, F. Howse, K. Gundersen, R. Johnson, R. Kelly, R. Little, K. Orcutt, R. Parsons, C. Rathbun, M. Sanderson, S. Stone. (1997). BATS methods manual. Version 4. U.S. JGOFS Planning Office, Woods Hole, 136 pgs.
- Lewis, E.L., Perkins R.G. (1981). "The Practical Salinity Scale 1978: Conversion of existing data". *Deep-Sea Research*. 28 A (4): 307-328.
- UNESCO. (1981). "Tables océanographiques internationales". 3rd volume. *Unesco Technical Papers in Marine Science*, 39, 35 pgs.

Method 4. Determination of Hydrogen Sulfide

Xiaona Li and Yrene Astor

Introduction

This procedure describes the method for total dissolved sulfide (H_2S , HS^- and S^{2-}) in seawater using a spectrophotometric method described by Cline (1969) and modified according to Hayes *et al.* (2006). The results are expressed in units of $\mu\text{mol L}^{-1}$ of sulfide in seawater. The range of concentration is between 0 and $1000 \mu\text{mol L}^{-1}$. The accuracy of the method is 3.3% and the detection limit of the analysis is $0.6 \mu\text{mol L}^{-1}$.

Principles of Analysis

Hydrogen sulfide present in seawater samples reacts with a solution of acidic ferric chloride and N,N-dimethyl-p-phenylenediamine sulfate to form methylene blue which can be subsequently measured by spectrophotometry.

Interferences

1. The presence of bubbles, agitation and sample manipulation during sample collection or handling of standards can result in errors because they can introduce oxygen to the sample.
2. The stock and standard hydrogen sulfide solutions are very unstable and the concentration of the standard solution can change quickly (before the $\text{Zn}(\text{Ac})_2$ fixing reagent is added). It is important to perform the analysis in less than 2 hours after addition of the diamine.
3. Color development depends on the pH of the sample; therefore, dilutions are made with seawater free of sulfur to buffer pH.
4. The presence of thiosulfate in the sample may inhibit the reaction that develops color, the inhibition time depending on the concentration of thiosulfate.

Materials

1. Automatic pipette with capacity of 5 mL.
2. Vials with a capacity of 20 mL.
3. Glass syringe, capacity 10 mL (Hamilton gas-tight) with Teflon[®] tip plunger. This syringe should be tested to make sure bubbles could easily be expelled from syringe. Some syringes have a shape that makes this very difficult, so several syringes should be purchased and tested prior sampling.
4. Plastic syringe, capacity 60 mL, with Tygon[®] tubing 60 cm in length, connected to its tip.
5. Transparent Tygon[®] tubing for water sampling from the Niskin bottle, internal diameter no greater than 4 mm. Use silicon Tygon[®] tubing in case dissolved or total organic carbon samples are taken afterwards. Soak the tubing in clean seawater for 24 hours before the cruise to minimize the amount of bubbles that stick to the tubing during sampling.

Equipment

1. Spectrophotometer, equipped with cells with optical pathlength 1 and 10-cm.

Reagents

Depending on the concentration of sulfur present in the sample, the concentrations of reagents and dilution factors vary. See Cline (1969) for samples with concentrations lower than 3 or more than 40 $\mu\text{mol L}^{-1}$.

1. **Zinc acetate solution (0.05 M).** Weigh 1.1 g of zinc acetate ($\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2$, $\text{Zn}(\text{Ac})_2$) and dissolve in 100 mL of distilled water. The reagent is stable and it is used to fix the sulfide.
2. **Mixed diamine solution (sulfide concentrations between 0 and 44 $\mu\text{mol L}^{-1}$).** Weigh 4 g of analytical reagent quality ferric chloride (FeCl_3) and 1.6 g of N,N-dimethyl-p-phenylenediamine sulfate ($\text{C}_8\text{H}_{12}\text{N}_2\text{H}_2\text{O}_4\text{S}$, molecular weight: 234.28 g mol^{-1}). Add to 100 mL 6N HCl and mix. The reagent is stable for a month if stored in an amber bottle at 4 °C.
3. **Nitrogen gas.**
4. **Distilled water free of oxygen.** Prepare boiled distilled water and let it reach room temperature while bubbling with nitrogen gas.
5. **Stock sulfide solution.** Prepare just before beginning the analysis. Pour 250 mL degassed distilled water while the water is still hot (to minimize oxygen diffusion) into a 250 mL volumetric flask, and pour 90 mL of degassed distilled water into a second 100 mL volumetric flask, bubbling nitrogen gas into both flasks while the water reaches room temperature. Blot ca. 0.5 g of analytical quality sodium sulfide ($\text{Na}_2\text{S}\cdot 9\text{H}_2\text{O}$) with a Kimwipe or paper towel. Make sure towel does not shed fibers. Write down the exact weight of the solid to calculate the exact concentration of the stock and standard solution. Add the solid to the 250 mL flask, mix and fill to the line of the volumetric flask with degassed distilled water. Dissolve the solid completely. Pipet 5 mL stock solution to the other 100 mL flask to make a more diluted standard solution. These solutions should be used immediately. During the preparation of the stock solution, keep air contact to a minimum; hence, both the weighing of the reagent as well as the dissolution in the flask should be implemented as quickly as possible. These solutions are very unstable; therefore, stock solution preparation and calibration curve should be made as quickly as possible.
6. **Sulfuric acid solution (1:1, v/v).**
7. **Starch indicator.** Dissolve 1 g of soluble starch in 100 mL of distilled water and heat until turbidity disappears. Add a few drops of chloroform as preservative and refrigerate. This solution is stable for 2 weeks. Renew again if a pure blue color is not developed when titrating.
8. **Standard thiosulphate solution (0.01 N).** Dissolve 2.48 g of sodium thiosulphate ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3\cdot 5\text{H}_2\text{O}$) in 1000 mL of distilled water. This solution is unstable, so prepare before each analysis and keep refrigerated in an amber bottle if not used immediately. Normalize every day.
9. **Potassium iodate standard solution (0.01 N).** Dry the potassium iodate (KIO_3) in an oven to 105 °C for one hour, cool in a desiccator and weigh exactly 0.3567 g. Dissolve in distilled water and adjust the volume to 1000 mL. This solution is stable indefinitely if evaporation is prevented.

10. **Potassium iodide solution.** Dissolve 20 g of potassium iodide (KI) in 100 mL of distilled water.

Sampling

Samples are taken in triplicate and should be the first ones to be sampled from the Niskin bottle. Hydrogen sulfide is volatile, and it oxidizes very rapidly when exposed to oxygen; therefore, it is important to take precautions during sampling to prevent this interference.

1. Place a 60 mL plastic syringe barrel in a ring stand clamp and connect the Tygon[®] tubing to the spigot of the Niskin bottle (Figure 1). Allow the flow of water to fill the barrel from the bottom, rising up through the syringe. Flow should be continued at a slow rate during sampling, which minimizes contact with air and in turn prevents the formation of bubbles. Place the tip of the gas-tight syringe below the surface of the ascending flow and rinse the glass syringe three times with the water sample. Vent any bubbles that are trapped after the first rinse. Collect 4 mL of sample while maintaining the time of contact between the piston and the sample to a minimum. Avoid the formation of bubbles during sampling.
2. Place the sample in a 20 mL vial slightly tilted that contains 0.5 mL Zn(Ac)₂ as fixing reagent. The inclination reduces the reaction time between the sulfur in the sample and Zn(Ac)₂. Screw top on tightly and stir gently but make sure that any Zn(Ac)₂ on cap is included.
3. Store the sample at 4 °C in the dark as soon as possible. At this temperature, the sample can remain stored for up to one month.
4. In a plastic bottle of 1 L, collect enough water from a depth with a similar alkalinity to samples so buffering will be similar between samples and standards. Store at 4 °C. This water **free of sulfur** is oxygenated and used for pH control for the various dilutions to be done both to samples as well as to the standard solutions.

Sample Analysis

Turn on the spectrophotometer 15 minutes before beginning the analysis to stabilize.

1. Samples must reach room temperature before beginning analysis.
2. Add 0.05 mL (50 µL) of the mixed diamine solution with an automatic pipette. Stopper immediately and shake the vial.
3. Let the solution stand for 20 minutes protected from light.
4. Dilute sample with 5 mL of seawater free of sulfide. Cover and mix quickly. Let the solution stand again for 15 minutes protected from light.
5. Measure the absorption of the samples in a 1-cm cell at 670 nm for samples containing sulfur concentrations greater than 3 µmol L⁻¹. For those with concentrations lower than 3 µmol L⁻¹ use a 10-cm cell.
6. Samples with high concentrations of hydrogen sulfide may have to be diluted once the color has fully developed. However, this is not recommended as it increases the uncertainty of the method. The highest absorption should be less than 0.8 since the aqueous methylene blue solutions do not conform to Beer's law at high concentrations (Cline, 1969).

Calibration

1. The range of concentration of the calibration curve should cover the range expected in the samples to study. See Cline (1969) for more details about reagents preparation and dilution factors for concentrations greater than $40 \mu\text{mol L}^{-1}$.
2. **Solutions for standard curve.** For a sulfur concentration range between 0 to $40 \mu\text{mol L}^{-1}$, volumes of 0.1, 0.2, 0.3 and 0.4 mL of the standard solution are added in vials containing 0.5 mL of $\text{Zn}(\text{Ac})_2$.
3. Dilute with 4 mL of seawater free of sulfide, and add 0.05 mL (50 μL) of the mixed diamine solution with an automatic pipette. Cover and invert the vials.
4. Allow the diluted standards to rest for 20 minutes protected from light.
5. Dilute with another 5 mL of seawater free of sulfide, and let stand again for 15 minutes protected from light.
6. Measure the absorption of the standard solutions in a 1-cm cell at 670 nm. The concentration of sulfur in each vial is calculated from the amount of sodium sulfide added and dilution factors.

Standard Solution Calibration

Carry out the calibration of the standard solution immediately after its preparation:

1. Add 10 mL of potassium iodide solution and 10 mL of the potassium iodate solution to six Erlenmeyer flasks with barrelhead stopper.
2. Add 1 mL of H_2SO_4 to each flask.
3. With a calibrated volumetric pipette, add 50 mL of the sulfide standard solution to three of the flasks, and 50 mL of oxygen-free distilled water to the other 3 flasks.
4. Allow to stand for 10 min.
5. Titrate with standard thiosulfate solution using a starch solution as indicator.
6. The volume of thiosulfate among replicates should agree to within ± 0.05 mL.
7. Calculate the amount of H_2S present with the following formula:

$$\mu\text{mol L}^{-1} \text{H}_2\text{S} = 10^6 * M * \frac{(A - B)}{2V} \quad (1)$$

where

A = average titers of the three solutions without sulfur, in mL.

B = average titers of the three solutions with sulfur, in mL.

V = volume of the sulfur standard solution, 50 mL.

M = concentration of the thiosulfate solution (mol L^{-1}).

Blank Analysis

The amount of hydrogen sulfide in seawater with oxygen is negligible, so it can be used as a blank.

1. Place in a vial 0.5 mL $\text{Zn}(\text{Ac})_2$ and add 4 mL of seawater free of sulfide.

2. Add 0.05 mL of the mixed diamine solution with an automatic pipette, stopper and mix.
3. Let the solution stand for 20 minutes.
4. Measure the absorption in a 1-cm cell at 670 nm. The value obtained depends on the purity and concentration of the reagent, turbidity of the sample and the difference between cells (Cline, 1969).

Calculation and Expression of Results

The amount of hydrogen sulfide dissolved in seawater is calculated using the following equation:

$$[\text{H}_2\text{S} (\mu\text{mol L}^{-1})] = \frac{2.388 - (\text{Abs}_s - \text{Abs}_b)}{p} \quad (2)$$

where

2.388 = dilution factor (calculated from the volumes of $\text{Zn}(\text{Ac})_2$ + sample + water free of sulfur + diamine solution)/4.

Abs_s = absorption of the sample.

Abs_b = absorption of blank.

p = slope of the calibration linear curve calculated from sub-standard solutions with absorption less than 0.8.

References

- Cline, J.D. (1969). "Determination of hydrogen sulfide in natural water". *Limnology and Oceanography*. 14(3): 454-458.
- Hayes, M.K. y G.T. Taylor. (2006). "Vertical distributions of thiosulfate and sulfite in the Cariaco Basin". *Limnology and Oceanography*. 51(1): 280-287.

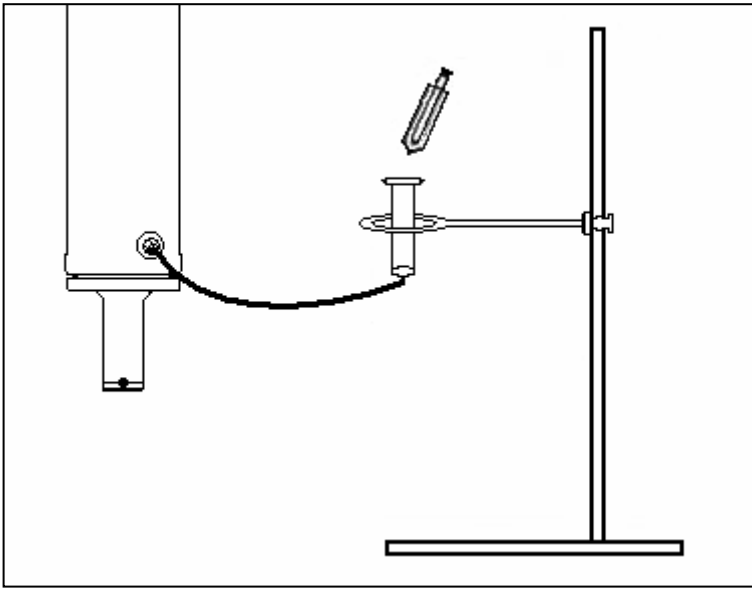


Figure 1: Sampling method for H₂S samples.

Method 5. Determination of Dissolved Oxygen

Yrene M. Astor

Introduction

This procedure describes the method for the determination of dissolved oxygen in seawater through a technique based on the Winkler method (Winkler, 1888; Carpenter 1965), modified by Aminot and Chaussepied (1983). The detection limit is 0.06 mL L^{-1} , the accuracy of the method is $\pm 0.03 \text{ mL L}^{-1}$.

Principle of Analysis

Dissolved oxygen in the sample reacts with manganese in a strong alkaline medium to generate a precipitate ($\text{MnO}(\text{OH})_2$). The sample is then acidified to a pH between 1.0 and 2.5 that would dissolve the precipitate and release iodine in quantities equivalent to chemically dissolved oxygen content in the original sample. The iodine released is titrated using a standardized solution of sodium thiosulphate, which reduces the iodine to iodide. An indicator solution (starch) detects the endpoint of the titration. With this method, four moles of thiosulphate are equivalent to one mole of dissolved oxygen (Aminot and Chaussepied, 1983).

Interference

1. In waters with high concentrations of oxidizing agents and/or reductants (iron, sulfite, thiosulphate, nitrite, etc.), positive or negative interferences are present. Organic compounds susceptible to fix iodine as well as substances that are oxidized in an acid medium are another source of error (Aminot and Chaussepied, 1983).
2. Introduction of air bubbles inside the bottle as well as in the Tygon[®] tubing used for sampling produces positive interference.
3. The transfer of the sample as well as vigorous agitation favors the dissolution of air in the sample and the loss of iodine because of its volatility. This is avoided titrating in the same flask where the sample is taken.
4. The titration should be done quickly to avoid atmospheric oxidation of iodide to iodine.
5. The visualization of the titration endpoint is difficult in waters that have elevated levels of color due to the presence of organic matter as well as of turbidity.

Materials

1. Volumetric pipettes (10 and 100 mL).
2. Automatic dispensers (0 to 2 mL).
3. Automatic pipettes with capacity of 1 mL.
4. Pyrex flasks, 125 mL capacity, used for determining iodine, with barrelhead stopper that project above liquid seal trough to facilitate removal of stopper. Wash the flask previously with distilled water and dried completely. Each flask and stopper must be identified and kept together at all times. The volume of the flask with the stopper on should be calculated gravimetrically (see section **Determination of Sample Volume**).

5. Tygon[®] tubing for sampling the Niskin bottle, with a diameter no larger than 4 mm. Use silicon tubing of the same diameter in case total or dissolved organic carbon (TOC and/or DOC) are taken following oxygen sampling.

Equipment

1. Piston burette with a resolution of 0.01 mL.
2. Magnetic stirrer.
3. Analytical balance, with appreciation of 0.1 mg.

Reagents

1. **Manganese solution.** Dissolve 600 g of manganous chloride tetrahyde ($\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$), or 670 g of manganous sulphate tetrahyde ($\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$), or 560 g of manganous sulphate dihydrate ($\text{MnSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), or 510 g of manganous sulphate monohydrate ($\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) in 1000 mL of distilled water. Keep at room temperature.
2. **Alkaline iodide solution.** Dissolve 320 g of sodium hydroxide (NaOH) in 300 mL of distilled water. Dissolve 600 g of sodium iodide (NaI) in 300 mL of distilled water while the solution is warmed up. Mix the two solutions at room temperature and adjust the volume to 1000 mL. If the samples have nitrite in quantities $> 3 \mu\text{mol L}^{-1}$, add 10 g of sodium azide (NaN_3) dissolved in 40 mL of distilled water before adjusting the volume. Keep at room temperature.
3. **Sulphuric acid solution.** Dilute 280 mL of concentrated sulphuric acid (H_2SO_4 , $d = 1.84 \text{ g mL}^{-1}$) in distilled water. Adjust the volume to 1000 mL.
4. **Starch indicator.** Dissolve 1 g of soluble starch in 100 mL of distilled water and heat until turbidity disappears. Add a few drops of chloroform as preservative and refrigerate. This solution is stable for 2 weeks. Renew again if a pure blue colour is not developed when titrating.
5. **Standard thiosulphate solution (0.01 N).** Dissolve 2.48 g of sodium thiosulphate ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) in 1000 mL of distilled water. This solution is unstable, so prepare before each analysis and keep refrigerated in an amber bottle if not used immediately. Normalize every day.
6. **Potassium iodate standard solution (0.01 N).** Dry the potassium iodate (KIO_3) in an oven to 105°C for one hour, cool in a desiccator and weigh exactly 0.3567 g. Dissolve in distilled water and adjust the volume to 1000 mL. This solution is stable indefinitely if evaporation is prevented.

Determination of Sample Volume

The volume of sample in each flask should be known with precision. The volumes are obtained by weight as follows:

1. Mark each flask along with their stoppers.
2. Wash and rinse with distilled water each flask, dry in an oven approximately at 100°C and allow it to reach room temperature.

3. Weigh each empty flask with its stoppers.
4. Fill the flask with distilled water and put the stopper on without leaving any air bubbles inside. Dry thoroughly, especially around the cap and at the edges with absorbent paper.
5. Weigh the flasks with distilled water.
6. Measure the temperature of distilled water inside the flasks.
7. Calculate the volume of water with the following formula:

$$V_{(\text{mL})} = \frac{P_2 - P_1}{D} \quad (1)$$

where

P_1 = weight of the empty flask (g).

P_2 = weight of the flask with distilled water (g).

D = density of distilled water at the temperature of the measurement (g mL^{-1}).

The density of distilled water at different temperatures is shown in Table 5.1.

Sampling

1. The samples for dissolved oxygen are collected from the Niskin bottles after taking samples for hydrogen sulfide. Samples are taken with a replicate.
2. Transparent flexible Tygon[®] tubing is used to collect the sample. This reduces the introduction of air bubbles while sample is taken. Raise the end of the hose, open the water flow and remove air bubbles by pressing the tubing with your fingers. Place the flask in an inverted position and locate the tubing to the bottom of it. Rinse the flask and its stopper twice with the sample before sampling. Place the flask in upright position and allow the water overflow before stoppering. Calculate the volume of water that should overflow by estimating the time the bottle takes to be filled in and then allow water to continue overflowing for a period equivalent to twice that time. While filling the flask hit the bottom with the stopper to prevent any bubbles to adhere to the glass. Remove the hose, by slowly lower the flask until the hose is ~ 1 cm below the water surface. Close the flow and remove the tubing with care.
3. Before placing the stopper, addⁱⁱ immediately 0.8 mL of the manganous solution and 0.8 mL of the alkaline solution, placing the tip of each dispenser below the surface of the sample while trying to avoid the formation of bubbles while adding the reagents. Stopper firmly, without remaining bubbles inside, and mix by inversion at least 15 times. Allow the precipitate to settle half way down the flask about 20 minutes and mix again.
4. Place seawater into the barrelhead stopper to avoid dryness and gas diffusion. Keep the flask at room temperature protected from light.
5. Analyze samples over a period no longer than 24 hours after sampling.

Sample Analysis

1. Before the analysis, allow the samples and reagents reach room temperature.

ⁱⁱ The dose of each reagent depends on the flask volume used at a proportion of 6 mL per liter of sample.

2. In the laboratory, withdraw the water that is around the barrelhead stopper top of the flask before beginning the analysis, trying not to cause turbulence in the sample that could disturb the precipitate. Remove the stopper and carefully add 0.8 mL of sulphuric acid solution. Mix the solution with a magnetic stirrer to dissolve the precipitate completely.
3. Titrate directly into the flask in less than an hour with sodium thiosulfate solution 0.01 N until obtaining a pale yellow colour.
4. Add 1 mL of starch indicator, which turns the solution blue. Continue titrating slowly until the solution becomes transparent and remain so for 20 seconds. The titration should not take more than 3 minutes.

Thiosulphate Calibration

A minimum of three standards for each group of samples should be done.

1. Add 10 mL of the potassium iodate standard solution 0.01 N in a clean flask.
2. Add approximately 100 mL of distilled water.
3. Add 0.8 mL of sulphuric acid solution and mix.
4. Add 0.8 mL of the alkaline solution and mix.
5. Titrate immediately following steps 3 and 4 of **Sample Analysis**.

Determination of Blank

Analysis of blank (B_{ana}). Reagents may contain reducing or oxidants impurities that may be controlled by doing a blank.

1. Add 1 mL exactly of the potassium iodate standard solution 0.01 N to a very clean flask.
2. Add 100 mL of distilled water with a volumetric pipette.
3. Add 0.8 mL of sulphuric acid solution and mix.
4. Add 0.8 mL of the alkaline solution and mix.
5. Finally add 0.8 mL of the manganous solution and mix.
6. Titrate immediately until the point of equivalence (V_1).
7. Add again 1 mL of the potassium iodate 0.01 N standard solution and titrate immediately with thiosulphate (V_2).
8. The analysis blank is:

$$B_{ana} = (V_1 - V_2) \quad (2)$$

Standard blank (B_{est}). Repeat steps 1 to 8 as described for B_{ana} but do not add manganous solution.

Calculation and Expression of Results

The concentration of dissolved oxygen is calculated using the following equation:

$$[\text{O}_2 \text{ (mL L}^{-1}\text{)}] = 559.8 * \frac{(\text{VT} - \text{B}_{\text{ana}})}{(\text{V}_{\text{std}} - \text{B}_{\text{std}})} * (\text{V}_{\text{sam}} - \text{V}_r) - 0.01 \quad (3)$$

where

VT = thiosulphate volume used for titrating the sample.

B_{ana} = analysis blank.

V_{std} = average volume of thiosulphate used to titrate the three standard solutions.

B_{std} = standard blank.

V_{sam} = sample volume in the flask (see section **Determination of Sample Volume**).

V_r = volume of reagents used to fix the sample.

References

- Aminot, A.; Chaussepied, M. (1983). *Manuel de Analyses Chimiques en Milieu Marin*. Francia: Centre National pour L'Exploitation des Océans, 395 pgs.
- Carpenter, J.H. (1965). "The accuracy of the Winkler method for dissolved oxygen analysis". *Limnology and Oceanography*, 10: 135-140.

Table 5.1: Density of distilled water at a temperature t °C

T (°C)	D (g cm ⁻³)
20	0,99823
22	0,99777
24	0,99730
26	0,99679
28	0,99623
30	0,99567

Method 6. Determination of pH

Yrene M. Astor

Introduction

This procedure describes the method to determine pH of seawater on the total hydrogen ion concentration (pH_T) pH scale, using spectrophotometric measurements developed by Clayton and Byrne (1993). The method is described in Dickson *et al.* (2007). The total hydrogen ion concentration is expressed in moles per kilogram of seawater. Spectrophotometric pH measurements are simple, fast and precise (Clayton and Byrne, 1993). The precision of the method is of ± 0.001 units of pH. The high levels of hydrogen sulfide in anoxic waters shorten the life of the electrodes used by other potentiometric methods; therefore, it is better to use a spectrophotometric method in this type of waters.

Principles of Analysis

The pH of a sample is determined by a spectrophotometric method adding a sulfonephthalein indicator, also called *m*-cresol purple. The method is based on measuring the absorbance spectrum of the indicator, which has a $\text{p}K$ value around the pH of seawater and the acid (HI^-) and basic (I^{2-}) forms of the indicator. The uncertainty level is equivalent to an imprecision in the total hydrogen ion concentration of $\pm 0.1\%$ where

$$\text{pH}_T = -\log [\text{H}^+]_T \quad (1)$$

$$[\text{H}^+]_T \cong [\text{H}^+] + [\text{HSO}_4^-] \quad (\text{Byrne } et \text{ al.}, 1999) \quad (2)$$

When spectrophotometric means are used in the analysis, the pH in the sample is determined from the following formula:

$$\text{pH}_T = \text{p}K_2 + \log_{10} \left[\frac{[\text{I}^{2-}]}{[\text{HI}^-]} \right] \quad (3)$$

where

$\text{p}K_2$ = dissociation constant for species HI^- (expressed on the scale of the total hydrogen ion concentration in mol kg-solution).

The ratio $[\text{I}^{2-}]/[\text{HI}^-]$ is calculated by measuring the absorbance of both species at two wavelengths (434 y 578). For each corresponding wavelength, the maximum absorbance of the basic and acid form of the *m*-cresol purple indicator is used to calculate the absorbance ratio ($R = A_{578}/A_{434}$) which describes the extension of the protonation of the indicator.

$$\frac{[\text{I}^{2-}]}{[\text{HI}^-]} = \frac{R_{(25)} - 0.00691}{2.222 - (R_{(25)} * 0.1331)} \quad (4)$$

where

$R_{(25)}$ = absorbance ratio (A_{578}/A_{434}) at 25°C.

A_λ = corrected absorbances measured at wavelengths corresponding to the maximum absorbances of the basic (HI^-) and acid (I^{2-}) form, respectively.

Interferences

1. Temperature has influence on the spectrophotometric measurements of pH since it affects the formation constant of HI^- and molar absorptivities of the *m*-cresol purple indicator; therefore, perform the analysis at a temperature of 25 ± 0.1 °C.
2. The presence of air bubbles during sampling can alter the sample. Take the same precautions as with sampling dissolved oxygen (**Method 5**).
3. Yao *et al.* (2007) demonstrated that *m*-cresol purple has impurities that contribute to apparent deviations of the pH of up to 0.01 units of pH. Therefore, the analyst must maintain a record of the source and lot number of the indicator in order to be able to carry out corrections to the data once indicators with a degree of greater purification can be obtained and better characterizations can be performed.

Materials

1. Silicone Tygon[®] tubing for sampling from Niskin bottle, with a diameter less than 4 mm. This kind of tubing is used when samples for total and dissolved organic carbon are taken after pH. Soak the hose in clean seawater for 24 hours before the cruise to decrease the number of bubbles that adhere to the hose during sampling.
2. Optical glass cells, 10-cm light path, with Teflon[®] caps. Be sure to have enough cells for each sample and each replicate.
3. Gilmont micrometer syringe with an accuracy of 0.5%, with a thin Teflon[®] tube attached to the tip of the dispenser.

Equipment

1. Spectrophotometer with a bandwidth of 380 - 850 nm for spectral measurements.
2. Thermostatic sample compartment to accommodate cells of 10-cm where temperature can be regulated within ± 0.1 °C.
3. Water bath with thermocirculator with temperature control of ± 0.05 °C that regulates the temperature of the compartment as well as of the entire system.

Reagents

1. **Solution of *m*-cresol purple ($\sim 2 \text{ mmol dm}^{-3}$)**. Weigh 0.0809 g of *m*-cresol purple, sodium salt ($\text{C}_{21}\text{H}_{17}\text{NaO}_5\text{S}$, molecular weight: $404.41 \text{ g mol}^{-1}$) in 100 mL of distilled water. Adjust the pH of the solution to be in the range of 7.9 ± 0.1 pH units before each cruise.

Sampling

1. Draw the samples after collecting H₂S and dissolved oxygen. Adapt tubing to the tip of the Niskin bottle to capture the sample while avoiding air bubbles during sampling and thus diminishing this interference. Draw the sample directly into the cell.
2. Connect the tubing to the bottom inlet of the cell while keeping the cell in a vertical position, and allow water to flow in smoothly without bubbles. Flush three times with the sample while pressing the tubing with the fingers to eliminate air bubbles.
3. Place the cell horizontally and allow the water to overflow at least two volumes of the cell. This can be estimated by counting while cell fills.
4. While the flow continues, carefully place the Teflon[®] cap in one of the openings of the cell without trapping air bubbles inside. Remove the hose and place the second Teflon[®] cap.
5. Store the cell in the dark at room temperature while waiting analysis. Analyze as quickly as possible (less than 30 min).

Sample Analysis

Turn on the equipment 15 minutes before beginning the analysis so it stabilizes.

1. Place cells containing the samples in a Ziploc[®] bag and put inside a thermostatic bath to 25 °C for 15 minutes.
2. Clean and dry the exterior of the cell and place it in the thermostatic compartment at 25 °C.
3. Calibrate the spectrophotometer with the sample and add 20 µL of *m*-cresol purple indicator to the cell with a microsyringe. Replace the cap trying to avoid trapping air bubbles and mix the sample with the indicator.
4. Measure the absorbances at three wavelengths: 730 nm corresponding to a non-absorbing wavelength of *m*-cresol purple, and 578 and 434 nm, which correspond to the maximum absorbance of the base (I²⁻) and the acid (HI) of the indicator respectively.

Calculation and Expression of Results

The pH of seawater is obtained through the following formula:

$$\text{pH}_T = \text{p}K_2 + \log_{10} \left[\frac{R_{(25)} - 0.00691}{(2.222 - (R_{(25)} * 0.1331))} \right] \quad (5)$$

where

$\text{p}K_2$ = dissociation constant for HI species (expressed on the total hydrogen ion concentration pH scale in mol kg-soln).

$R_{(25)}$ = absorbance ratio ($R = A_{578}/A_{434}$) measured at 25 °C.

Dissociation constant K_2 for *m*-cresol purple depends on salinity and temperature and it is obtained from the formula in Clayton and Byrne (1993):

$$\text{p}K_2 = \frac{1245.69}{T} + 3.8275 + F + 0.00211 (35 - S) \quad (6)$$

where

T = water bath temperature, in degrees Kelvin.
S = sample salinity.
F = correction according to DelValls and Dickson (1998): 0.0047.

The correction factor arises because addition of the indicator alters the pH. Therefore, it is necessary to calculate a correction factor to obtain better results (see Dickson *et al.*, 2007).

The absorbance ratio $R_{(25)}$ is obtained from the following formula:

$$R_{(25)} = \frac{(A_{5781} - A_{7301})}{(A_{4341} - A_{7301})} \quad (7)$$

where

$A_{\lambda I}$ = absorbances of seawater with *m*-cresol purple indicator at wavelength 434, 578 and 730 nm.

References

- Byrne, R.H.; McElligot S.; Feely R.A.; Millero F.J. (1999). "The role of pH_T measurements in marine CO_2 -system characterizations". *Deep-Sea Research I*. 46: 1985-1997.
- Clayton, T.D.; Byrne, R. H. (1993). "Spectrophotometric seawater pH measurements: total hydrogen ion concentration scale calibration of *m*-cresol purple and at-sea results". *Deep-Sea Research*. 40: 2115-2129.
- DelValls, T.A.; Dickson, A.G. (1998). "The pH of buffers based on 2-amino-2-hydroxymethyl-1,3-propanediol ('tris') in synthetic sea water. *Deep-Sea Research*. 45: 1541 – 1554.
- Dickson, A.G.; Sabine, C.L.; Christian, J.R. (Eds.). (2007). Guide to Best Practices for Ocean CO_2 Measurements. PICES Special Publications 3, 191 pgs.
- Yao, W.; Liu, X.; Byrne, R.H. (2007). "Impurities in indicators used for spectrophotometric seawater pH measurements: Assessment and remedies". *Marine Chemistry*. 107: 167 – 172.

Method 7. Determination of Total Alkalinity

Yrene M. Astor

Introduction

This procedure describes the method for the determination of total alkalinity in seawater using spectrophotometric measurements, according to Breland and Byrne (1993) and Yao and Byrne (1998), modified according to suggestions of Dr. Wensheng Yao. The results are expressed in $\mu\text{mol kg}^{-1}$ of seawater. The precision of the method is $\pm 2 \mu\text{mol kg}^{-1}$ and it is suitable for oceanic levels of total alkalinity between 2000-2500 $\mu\text{mol kg}^{-1}$.

Principle of Analysis

A known volume of seawater is acidified with a solution of 0.1N HCl to a pH between 3.8 y 4.2. The content of CO_2 is purged from the acidified sample using nitrogen gas. The excess of acid is quantified by means of spectrophotometric measurements using a sulfonephthalein indicator, bromocresol green. The absorption maxima for the species I^{2-} (616 nm) and HI^- (444 nm) are the ones used in the spectrophotometric measurements of alkalinity.

Interferences

1. Temperature influences alkalinity spectrophotometric measurements since it affects the formation constant HI^- and the molar absorptivities of the sulfonephthalein indicator; therefore, the analysis must be performed to a constant temperature of $25 \pm 0.1 \text{ }^\circ\text{C}$.

Materials

1. Cells of 10-cm light optical glass path with Teflon[®] caps.
2. Syringe, micrometer with an accuracy of 0.5%, calibrated to 2 mL, with thin Teflon[®] tubing adhered at the tip to dispense the indicator.
3. Amber borosilicate bottles, 250 mL, previously washed with detergent and deionized water.
4. Plastic syringe, capacity 5 mL, with a thin Teflon[®] tubing adhered to the tip.
5. Tygon[®] tubing for sampling from the Niskin bottle, with a diameter no greater than 4 mm. It is necessary to immerse the tubing in filtered seawater for 24 hours before the cruise to minimize the quantity of bubbles that stick to the hose during sampling.

Equipment

1. Double beam spectrophotometer for spectral measurements with a bandwidth of 380 – 850 nm.
2. Analytical balance, with accuracy of 0.001 g.
3. Thermostatic compartment to accommodate cells of 10-cm where the temperature could be regulated inside to a range no greater than $\pm 0.1 \text{ }^\circ\text{C}$.

4. Water bath with termocirculator with temperature control of ± 0.05 °C that regulates the temperature of the compartment as well as of the whole system.
5. Magnetic agitators.

Reagents

1. **Saturated mercury chloride.**
2. **Bromocresol green indicator** ($\sim 2 \times 10^{-3}$ M). Weigh 0.216 g of bromocresol green, sodium salt ($C_{21}H_{13}Br_4NaO_5S$, molecular weight: $720.06 \text{ g mol}^{-1}$) and dilute to 100 ml with distilled water. Adjust the pH of the solution to 4.5.
3. **Hydrochloric acid, 0.1 N.** Dilute 8.3 ml of hydrochloric acid (38% HCl) in distilled water. Complete to one liter.
4. **Nitrogen gas of high purity.**
5. **Reference material for measurements of oceanic CO_2 .** Supplied by Dr. Andrew G. Dickson of Marine Physical Laboratory (7110 Route Capri, The Jolla, California. 92037-3917, USA).

Sampling

1. Connect the Tygon[®] tubing to the mouthpiece of the Niskin bottle, put the tubing in the bottom of the amber bottle, wash with the sample three times and fill allowing the water overflows the bottle. Calculate the volume of water that should overflow by estimating the time the bottle takes to be filled in and then allow water to continue overflowing for a period equivalent to twice that time.
2. Raise the tubing near the mouth of the bottle, close the spigot and withdraw the tubing. This technique leaves an air space in the bottle of approximately 2.5 mL (1% of the total volume of the bottle) which allows the expansion of the water for changes in temperature.
3. Add with an automatic pipette 50 μL (0.02% of the total volume of sample) of a solution of saturated mercury chloride in order to prevent biological activity.
4. Close the bottle and mix the solution.
5. Keep refrigerated, not frozen. Replicates of three different depths are taken from each station. Samples can be refrigerated for no more than three months.

Sample Analysis

Turn on all the equipments 15 minutes before beginning the analysis to stabilize. Check the pH of the indicator (< 4.5) and calibrate the analytical balance. Allow the samples, standard solution and reagents reach room temperature before the analysis. During the manipulation of the flasks and the syringes, hands must remain clean and dry. The following procedure is performed to the samples and to the standard solutions:

Measurement of absorbances before titration

1. Place the cell with the sample (or standard solution) in a Ziploc[®] bag and put inside a thermostatic bath at 25 °C for 15 minutes.

2. Dry the exterior of the cell and place it in the thermostatic compartment at 25 °C.
3. Measure the absorbances at the following wavelengths: 444, 616 and 750 nm.

NOTE. Use the same cell to measure the absorbances before and after the titration. Replicates should be measured in the same cell.

Titration

1. Weigh with a precision of 0.01 g enough empty flasks of 125 mL according to the number of samples and standard solutions to be measured.
2. Add 100 mL of sample (or standard solution) to a flask with a volumetric pipette placing the tip of the pipette at the bottom of the flask.
3. Weigh the flask with the sample (or standard solution). The difference in weight between the flask with sample and the empty flask represents the sample volume (V_m).
4. Add with a micrometer syringe 80 μ L of bromocresol green indicator while mixing.
5. Weigh with a precision of 0.001 g a plastic syringe with 0.1N HCl, and titrate.
6. Add acid to the sample slowly while mixing until a green yellowish color (pH between 3.8 and 4.2) appears. Place the tip of the dispensing tubing close to the surface of the liquid trying that the acid falls without splashes assuring the total mixture of the acid with the sample.
7. Weigh again the syringe. The difference of weight before and after the titrations represents the volume of the acid added (V_a).
8. Continue mixing while supplying nitrogen gas for 5 minutes.

Measurement of absorbances after titration.

1. Fill a 10-cm cell with the sample and place inside a Ziploc[®] bag and place it in a thermostatic bath to 25° C for 15 min.
2. Dry the exterior of the cell and place it in the thermostatic compartment at 25 °C.
3. Measure the absorbances to the following wavelengths 444, 616 and 750 nm while the temperature is kept to 25 °C.

Calculation and Expression of Results

The absorbance measured to 750 nm is used to control and correct any diversion of the base line in the absorbances that are used to calculate the ratio of absorbances ($R = A_{616}/A_{444}$). The alteration must not be greater than ± 0.001 .

The total alkalinity is calculated using the following equation:

$$(AT)_s = \frac{\{(M_a V_a) - [(H^+)_{T} V_{sa}]\} \times 1000}{V_s} \quad (1)$$

where

(AT)_s = total alkalinity of the water sample in $\mu\text{mol kg}^{-1}$.

M_a = concentration of HCl added during titration.

$$M_a = 10^{-\text{pH}_{\text{sws}}} * \frac{(V_s + V_a)}{V_s} + \text{AT}_{\text{std}} + \frac{V_s}{V_a} \quad (2)$$

V_s = volume (or mass) of the seawater sample before titration.

V_a = volume (or mass) of the added acid.

V_{sa} = volume (or mass) of the seawater after titration.

AT_{std} = total alkalinity of the standard solution (Marine Physical Laboratory) according to standard certificate.

(H⁺)_T = total concentration of the excess of ions of hydrogen in the seawater sample after removing completely the CO₂ = $[(10^{-\text{pH}_{\text{sws}}} + [\text{HI}])]$

where

$$(\text{H}^+) \text{ T} = [\text{H}^+]_{\text{T}} + [\text{HI}] \quad (3)$$

$$[\text{H}^+]_{\text{T}} = [\text{H}^+] + [\text{HSO}_4^-] + [\text{HF}] = 10^{-\text{pH}_{\text{sws}}} \quad (4)$$

$$\text{pH}_{\text{T}} = 4.2699 + 0.002578(35 - S_a) + \log \left[\frac{(R - 0.00131)}{(2.3148 - (0.1299)R)} \right] \quad (5)$$

$$\text{pH}_{\text{sws}} = \text{pH}_{\text{T}} - \log (1 - (0.001005 * S_a)) \quad (6)$$

where

pH_T = pH in the pH total scale.

pH_{sws} = pH in the seawater pH scale.

S_a = salinity of the solution after titration:

$$S_a = \frac{(S_s * V_s)}{(V_a + V_s)} \quad (7)$$

where

S_s = salinity of the sample before adding the acid.

$$R_{(25)} = \frac{[(A_{616I} - A_{750I}) - (A_{616WI} - A_{750WI})]}{[(A_{444I} - A_{750I}) - (A_{444WI} - A_{750WI})]} \quad (8)$$

where

R = quotient of absorbances (R = 616A/444A).

Abs_{λI} = absorbances at λ = 444, 616 y 750 nm with indicator.

Abs_{λWI} = absorbances at λ = 444, 616 y 750 nm without indicator

References

Breland, J. A.; Byrne, R.H. (1993). "Spectrophotometric procedures for determination of seawater alkalinity using bromocresol green ". *Deep-Sea Research I*, 40 (3): 629-641.

Yao, W.; Byrne, R.H. (1998). "Simplified seawater alkalinity analysis: use of linear array spectrometers". *Deep-Sea Research I*. 45: 1383-1392.

Method 8. Determination of Spectral Absorption Coefficients of the Particles and Phytoplankton.

Laurencia Guzman y Ramón Varela

Introduction

The size, nature and abundance of suspended particles in seawater has influence on the light climate in the water, which has a direct effect on the phytoplankton activity and distribution, and indirectly on the concentration of some chemical elements found in the photic layer. On the other hand, the inherent optical properties can reveal the characteristics and amount of particles in seawater. The following procedure describes the method to determine the spectral absorption coefficient for particles as well as for only phytoplankton. The technique measure the light absorption that goes through a wet filter that contains the particles (Kishino *et al.*, 1985).

Principles of Analysis

The method is based on the change observed in the spectrum of light absorption of a wet filter that retains the suspended particles of a seawater sample with respect to a reference filter (blank). The absorption spectrum is measured for the filter with the sample before and after the extraction of the pigments with hot methanol (60 °C). This technique determines the total absorption particle coefficient, $a_p(\lambda)$, and the detritus absorption coefficient (particles without their pigments), $a_d(\lambda)$. The difference in the optical transmission between these two parameters is related to the absorption coefficient of phytoplankton, $a_{ph}(\lambda)$. The results are expressed in m^{-1} .

Interferences

1. In the measurements, variations occur due to differences in the characteristics of particles in the water, the kind of equipment used (spectrophotometer or espectoradiometer) and the type of filter. This interference is corrected in particular for each case applying a pathlength amplification factor, β (Kishino *et al.*, 1985; Mitchell and Kiefer 1988; Bricaud and Stramski, 1990; Mitchell, *et al.* 2002).
2. If the extraction of pigments with the solvent is incomplete, the coefficient of the detritus material can be overestimated and this will affect the absorption coefficient of the phytoplankton. It is important to observe that there is no phytoplankton absorption at longer wavelengths (red).
3. The amount of material retained by the filter should not generate an optical density (OD) greater than 0.25 and lower than 0.05 when measured at 675 nm, or lower than 0.04 at 440 nm (Mitchell *et al* 2002). On the other hand, when the amount of material retained by the filter is too low, it is difficult to observe a change of color in the surface of the filter. To control the intensity of the color in the filter, the volume of water filtered must vary according to the amount of particles present in the sample.

Materials

1. Filters Whatman, GF/F, nominal 0.7 μm , 25 mm diameter.

2. Small Petri dishes (plastic).
3. Plastic syringe, 60 mL.
4. Tubing of 10 cm in length that is connected to the end of the syringe.
5. Drop Pasteur pipette with rubber bulb, 5 mL.
6. Funnel for filters of 25 mm diameter and with a capacity of 200 mL.
7. Graduated cylinder, 50 mL.

Equipment

1. Filtration unit and vacuum pump for sampling as well as for the laboratory.
2. *Measuring equipment*
 - a. Spectrophotometer with a bandwidth of 380 - 800 nm for spectral measurements, and an optical resolution of the instrument lower than 4 nm. In order to be able to measure the OD of the filters in a spectrophotometer, a special accessory is required (but not available from all manufacturers) that illuminates the totality of the area of the filter for light transmission and that measures the light that goes through it.
 - b. Another option is to use a spectroradiometer. This type of instrument measures the radiometric amounts in intervals of narrow wavelengths for given spectral regions. The equipment uses an optical fiber with a narrow angle of view that focuses on the total area of the filter. The filter is illuminated totally and uniformly with a halogen incandescent lamp. In the analyses of the CARIACO project, a Spectrascan PR-650 from Photo Research is used. A dark box is used with a light source that holds and illuminates the filter by transmission, and serves as a fixed support to focus the optical fiber. This kind of equipment receives the incident light beam and spreads different wavelengths in different angular directions after the light goes through the sample. The sensible element is a series of photodiodes that measure the different wavelengths. The useful range of these measurements is between 420 and 750 nm, since the shorter wavelengths are detected at very low intensities and the optical fiber that is used can absorb them strongly.
3. Water bath up to 60°C with a stability of ± 0.5 °C.
4. Measure the amount of chlorophyll present in the methanol extract that has washed the filter, using a spectrophotometer with 10-cm cells, following the procedure for spectrophotometric pigment analysis (Strickland and Parsons, 1972), or use a fluorometric technique to measure chlorophyll following **Method 13** of this manual.

Reagents

1. **Methanol** (CH₃OH).

Sampling

1. Draw water samples from the rosette into dark plastic 2 L bottles.

2. Filter the water through Whatman GF/F filters using a vacuum pump. Record the filtered volume. The volume to filter depends on the amount of particles in the water, which is indicated by the degree of saturation of the filter. In waters with moderate biomass (0.5 to 1 mg m⁻³ of chlorophyll), which is typical of waters near the coasts, an average volume of 2 L is enough. If water has more particles, reduce the volume to as little as 0.25 L. In oceanic waters, increase the volume until an appreciable coloration is produced on the filter.
3. Store each filter without folding in a Petri dish properly identified, with the surface that retains particles upwards.
4. Cover the dish with aluminum foil to avoid exposure to light.
5. Freeze the filters placing the dish horizontal until just before the analysis.

Sample Analysis

Turn on the lamp 15 minutes before beginning the analysis so it stabilizes.

1. *Sample preparation*

- a. Let the filters with the samples reach room temperature.
- b. Place absorbent paper, dampened with distilled water, below the filters inside the Petri dish to keep them moist. Use a spatula to raise the filter without touching its upper face, and keep the dish covered with aluminum foil all the time.
- c. Prepare a reference filter (blank) in the same way as in step 2.

2. *Analysis*

a. *Absorption of light by all particles (a_p)*

- i. Measure the optical density (OD) or the light absorption spectrum of the blank.
- ii. Measure the light absorption spectrum of the filter with the sample ($OD_{s(\lambda)}$).

b. *Absorption due to detritus material (a_d , extraction with hot methanol).*

- i. Place methanol in a bottle with the cover slightly open.
- ii. Warm up methanol in a water bath to a temperature of 60°C. **Wear gloves and safety glasses and work in a chemical fume hood during this part of the analysis.**
- iii. Place the filter with sample in a filtration funnel.
- iv. Add hot methanol to the filter in aliquots of 5 mL using a Pasteur pipette with a rubber bulb.
- v. Filter slowly while adding the methanol until 50 mL of methanol are used. Recover the filtered solution in a graduated cylinder under the filter holder.
- vi. Record the volume filtered into the cylinder. This volume can be used to determine chlorophyll concentration.
- vii. Measure the light absorption spectrum of the blank.
- viii. Measure the light absorption spectrum of the filter with the sample after being washed with methanol ($OD_{sw(\lambda)}$).

To determine the amount of chlorophyll *a* or calculate the pigment indexes by spectrophotometry and/or fluorometry (Strickland and Parsons, 1972), begin by mixing the extract of pigments in methanol with a syringe to which a small hose is attached at one end. This syringe is used to decant the extract to any recipient adequate for the measurements.

Calculation and Expression of the Results

The absorption coefficient for the visible band from 380 to 750 nm, with a resolution less than 4 nm, can be calculated by the following expressions:

1. The total particle absorption is calculated with the following equation:

$$a_p(\lambda) = A \left[\frac{(2.3 * OD_{s(\lambda)})}{(\beta * V)} \right] \quad (1)$$

where

$a_p(\lambda)$ = total absorption particle coefficient (m^{-1}).

A = filter used area = $3.63 \times 10^{-4} m^2$ for 25 mm filters.

$OD_{s(\lambda)}$ = corrected optical density = $OD_{s(\lambda)} - OD_{750}$

OD_{750} = Adjustment = average OD between 752 nm and 780 nm, where phytoplankton absorption is assumed to be zero.

β = $1.63 [(OD)^{-0.22}]$ (filter amplification factor; Mitchell and Kiefer, 1988, Bricaud and Stramski, 1990)

V = volume of filtered water in m^3 .

2. The absorption coefficient of detritus material is calculated with the following equation:

$$a_d(\lambda) = A \left[\frac{(2.3 * OD_{sw(\lambda)})}{(\beta * V)} \right] \quad (2)$$

where

$a_d(\lambda)$ = detritus absorption coefficient due to vegetal remains and other particles without chlorophyll (m^{-1}).

$OD_{sw(\lambda)}$ = corrected optical density = $OD_{sw(\lambda)} - OD_{750}$

The same calculations are used as for $a_p(\lambda)$, but using the absorbances of the filter after the extraction with hot methanol.

3. The phytoplankton absorption coefficient is calculated with the following equation:

$$a_{ph}(\lambda) = a_p(\lambda) - a_d(\lambda) \quad (3)$$

where

$a_{ph}(\lambda)$ = absorption coefficient due to phytoplankton pigments (m^{-1}).

References

- Bricaud, A.; Stramski, D. (1990). "Spectral absorption coefficients of living phytoplankton and nonalgal biogenous matter: A comparison between the Peru upwelling area and the Sargasso Sea." *Limnology and Oceanography* 35 (3): 562-582.
- Kishino, M.; Takahashi, M.; Okami, N.; Ichimura, S. (1985). "Estimation of the spectral absorption coefficients of phytoplankton in the sea". *Bulletin of Marine Science*. 37 (2): 634-642.
- Mitchell, G.; Kiefer, D.A. (1988). "Chlorophyll *a* specific absorption and fluorescence excitation spectra for light-limited phytoplankton". *Deep-Sea Research*. 35 (5): 639-663.
- Mitchell, G.; Kahru, M.; Wieland, J.; Stramska, M. (2002) "Determination of spectral absorption coefficients of particles, dissolved material and phytoplankton for discrete water samples" En: Mueller, J.L.; Fargion, G. F.; McClain, C. R. (Eds). *Ocean Optics Protocols For Satellite Ocean Color Sensor Validation, Revision 4, Volume IV: Inherent Optical Properties: Instruments, Characterization, Field Measurements and Data Analysis Protocols*. National Aeronautical and Space Administration NASA/TM –2003: Chapter 4: 39-64.
- Strickland, J. D. H.; Parsons, T. R. (1972). "A practical handbook of seawater analysis". *Fisheries Research Board of Canada*. Bulletin 167, 2nd edition, 310 pgs.

Method 9. Determination of Colored Dissolved Organic Matter.

Laurencia Guzman y Ramón Varela

Introduction

Colored dissolved organic matter (CDOM) is the result of the decomposition of organic compounds, mainly of plant origin, contributed by the rivers and the degradation of phytoplankton in the ocean. CDOM is defined as the material that goes through a filter of 0.2 μm , and it is quantified in units of absorbance (m^{-1}) for specific wavelengths. The absorption spectrum of CDOM exponentially decreases towards longer wavelengths, with its maximum of absorption in the ultraviolet. This procedure describes the method to determine CDOM using a spectrophotometric method in which the absorption coefficient of the dissolved material (a_g) is calculated based on the definition of Bricaud *et al.* (1981), Nelson and Siegel (2002) and Nelson *et al.* (2007).

Principle of Analysis

The absorbance of CDOM is measured in the ultraviolet and blue regions using a spectrophotometer. The absorption coefficient of the dissolved material is calculated from these values for desired wavelengths.

Interferences

1. Use recently distilled water for the blank and store in a refrigerator in the dark to prevent any alteration. A contaminated blank can affect the absorption coefficient of CDOM.
2. A fluctuating baseline can affect the absorption coefficient of CDOM; therefore, the baseline on the spectrophotometric measurements must be constant.
3. Filter the sample slowly to avoid breaking the filter (which allows particles to go through) or cell rupture on the filter (releasing intracellular components).
4. The exposure of the samples to light over long periods can result in a loss of color which affects the absorption coefficient of CDOM.

Materials

Wear polyethylene gloves all the time while handling samples and materials.

1. Nylon syringe filters, 25 mm in diameter and pore size 0.2 μm .
2. Plastic syringes without plungers.
3. 60 mL glass syringe with stainless steel laboratory pipetting needle (10.2 cm length).
4. Quartz cells, 10-cm pathlength, with Teflon[®] caps.
5. 60 mL amber glass bottles with Teflon[®] caps.

Reagents

1. **Hydrochloric Acid (HCl)**, concentration of 37% and a density of 1.19 g mL^{-1} , add 227 mL of HCl in 773 mL of distilled water carefully and slowly while mixing.

2. **Methanol** (CH₃OH), high reagent grade or better.

Equipment

1. Spectrophotometer with a bandwidth of 200-850 nm for spectral measurements.

Sampling

1. **Pre-treatment of sampling material**
 - a. Soak the amber bottles, their caps and the syringes in a solution of 10% HCl overnight at room temperature, then rinse with distilled water.
2. **Sampling**
 - a. Before sampling, remove the plunger from the plastic syringe and wash the syringe three times with the sample. Use the syringe to capture the sample while wearing polyethylene gloves.
 - b. Connect the filter to the tip of the syringe and filter the sample directly into the amber bottle. Rinse the amber bottle three times with the filtered sample and fill. Allow an air space in the bottle of approximately 1 mL (1% of the total volume of the bottle) for the expansion of the water when it freezes.
 - c. Store the sample at -20 °C.

Sample analysis

1. Suitable preservation of the sample allows storage without alteration for several months, as long as it remains frozen and protected from light.
2. Defrost the samples and allow them to reach room temperature.
3. Extract a sample from the bottle using a glass syringe with a pipeting needle.
4. Remove the needle and place a syringe filter of 0.2 µm on the syringe. Filter directly into the quartz cell rinsing three times with the sample. Fill three quarters of the cell without leaving any bubbles. Clean and dry the exterior of the cell perfectly.
5. Prepare a cell with recently distilled water (blank) at room temperature.
6. Measure the absorption spectra of the sample (absorbance, $A_{(\lambda)}$) zeroing the spectrophotometer with the blank. After finishing the measurement, samples should not be refrozen, but they can be refrigerated in their amber bottles for up to 3 to 4 days.
7. If it is necessary, correct fluctuations of the baseline by subtracting the absorbance value at the wavelength of 700 nm.

Calculation and Expression of Results

The calculation of the absorption coefficient of dissolved matter (a_g) is made using the following expression (Bricaud *et al.*, 1981):

$$a_g(\lambda) = 2.303 A_{(\lambda)}/L \quad (1)$$

where

$A_{(\lambda)}$ = absorbance at a determined wavelength (m^{-1}).

L = cuvette cell length (0.1 m).

References

- Bricaud, A.; Morel A.; Prieur, L. (1981). "Absorption by dissolved organic matter of the sea (yellow substance) in the UV and visible domains". *Limnology and Oceanography*. 26 (1): 43-53.
- Nelson, N.B.; Siegel, D. A. (2002). Chromophoric DOM in the open ocean. En: Hansell, D.A.; Carlson, C.A. (Eds.), *Biogeochemistry of Marine Dissolved Organic Matter*. Academic Press, San Diego, CA, pp. 509–546.
- Nelson, N.B.; Siegel, D.A.; Carlson, C.A.; Swan, C.; Smethie Jr., W.M.; Khatiwala, S. (2007). "Hydrography of chromophoric dissolved organic matter in the North Atlantic". *Deep-Sea Research, Part I*, 54: 710-731.

Method 10. Determination of Total and Dissolved Nitrogen and Organic Carbon

Laura Lorenzoni

Introduction

This procedure describes the method to determine total organic carbon (TOC), dissolved organic carbon (DOC), and total and dissolved nitrogen (TN and TDN) in seawater. TOC is the total content of carbon in seawater found in nonvolatile organic compounds. DOC is the fraction of the TOC that goes through a filter with pore diameter of 0.7 μm where the inorganic carbon is eliminated by acidification and aeration. TN is the sum of all nitrogen forms (inorganic and organic), and TDN is the dissolved fraction of total nitrogen in seawater, defined in the same way as the DOC. This determination uses a catalytic combustion method. The results are expressed in $\mu\text{mol L}^{-1}$ of carbon (nitrogen). The range of concentrations detected by this method is between 0 and 400 $\mu\text{mol L}^{-1}$ of dissolved organic carbon and between 0 - 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$ of total dissolved nitrogen. The method described is taken from Dickson *et al.* (2007).

Principle of Analysis

The method for TOC (DOC) is based on the total oxidation of nonvolatile organic compounds to CO_2 through catalytic combustion to 680 $^{\circ}\text{C}$. The seawater sample, filtered for DOC (and unfiltered for TOC), is acidified and sparged with oxygen before combustion. The sample is injected onto a combustion column packed with platinum-coated alumina beads held at 680 $^{\circ}\text{C}$. The amount of CO_2 produced during this process is measured with a Nondispersive Infrared Detector (NDID). For the analysis of TN (TDN), the sample is calcinated to convert the nonvolatile nitrogen compounds into NO forming chemiluminescence when mixed with ozone, which is measured with a photomultiplier.

Interferences

1. The inorganic carbon present in the sample produces a positive interference, which is eliminated when the sample is acidified and sparged with oxygen before the combustion.
2. Contamination of the sample can occur easily through air, contact with fingers or by touching the spout of the Niskin bottle without wearing gloves. It is necessary to be careful during sampling, handling, filtration and storage of the sample to prevent contamination. Some precautions are:
 - a. Wear polyethylene gloves all the time when collecting TOC and DOC samples as well as with those samples taken before TOC or DOC (like gases).
 - b. During sampling, only silicone hoses must make contact with the spout of the Niskin bottle, since any other type as Tygon[®] represents a source of contamination. Use silicone hoses with previous samples as well.
 - c. Avoid contact of the filter holder or the spout of the Niskin bottle with the polyethylene bottle used to capture the sample.
 - d. Avoid contact with grease.

- e. Store the sample in a freezer that does not contain, at present or previously, organic material or solvents.
3. Manipulation may be a source of contamination during the filtration process. It is better not to filter the samples with a low content of particulate organic carbon ($< 1 \mu\text{mol L}^{-1}$); however, filtration is necessary in samples with a high particle content (like in highly productive waters). In the Cariaco Basin, samples from depths above 250 m are filtered (see Table 1.3, **Method 1** for sampling depths) due to the high content of particles that are found in superficial waters, as well as near the interface where bacteria accumulate.

Materials

1. Filters Whatman GF/F, 47 mm diameter, calcinated during four hours at $450 \text{ }^\circ\text{C}$ and stored in closed glass petri dishes.
2. Silicone hoses and polycarbonate inline 47 mm filter holders washed in 10% HCL solution and rinsed three times with distilled water.
3. High Density Polyethylene (HDPE) bottles, capacity 60 mL, soaked in a 10% HCl solution for four hours, and rinsed three times with distilled water. Dry upside down on a clean surface.

Reagents

1. **High purity (99.995%) oxygen gas.**
2. **Combustion column catalyst.** Column packed with 2 mm platinum-coated alumina beads (Shimadzu P/N 017-42801-01) held at 680°C .
3. **Platinum gauze.** Pure platinum wire gauze (52 mesh, woven from 0.1 mm diameter wire), roughly formed into cubes ($\sim 0.5 \text{ cm}$ to a side). Three to five cubes are placed at the top of the combustion column bed.
4. **Consensus Reference Material (CRM).** Deep Sargasso Sea/Florida Straight water ($44\text{-}46 \mu\text{M DOC}$), available in 10 mL ampoules from the Department of Marine and Atmospheric Chemistry, University of Miami, RSMAS/MAC (<http://www.rsmas.miami.edu/groups/biogeochem/CRM>).
5. **Low Carbon Water (LCW).** Water with a carbon concentration between $1\text{-}2 \mu\text{mol C L}^{-1}$, which is also obtained from RSMAS/MAC.
6. **Hydrochloric acid (10% HCl).**
7. **Hydrochloric acid (HCl).** Trace metal analysis grade.
8. **Potassium hydrogen phthalate ($\text{C}_8\text{H}_5\text{O}_4\text{K}$).** Prepared according to the carbon concentration in the sample.
9. **Potassium nitrate (KNO_3).**
10. **Milli-Q[®] water.**

Equipment

1. Organic carbon analyzer Shimadzu TOC-V_{CSH} with autosampler ASI-V and total nitrogen detector TNM-1 (or equivalent). The carbon and nitrogen detectors function independently. If another type of instrument is used, perform an evaluation of its application in seawater.

Sampling

1. Samples are taken after sampling gases and pH. First, the sample for TOC (TN) is collected, followed by the DOC (TDN) sample.
2. TOC sample is collected directly from the spout of the Niskin bottle. Rinse the HDPE bottle three times with the sample and fill the bottle $\frac{3}{4}$ full. Freeze in a vertical position.
3. The DOC sample is collected by connecting an inline filter holder to the spout of the Niskin bottle using a flexible silicone hose. The sample is filtered through a calcinated fiber glass filter placed within the holder. Allow the water to flow about two minutes through the inline filter holder and the filter. Rinse the HDPE bottle three times with the sample and then fill the bottle $\frac{3}{4}$ full. Freeze in a vertical position.
4. Between casts, disassemble the filter holders and submerge them in 10% HCl. Rinse several times with distilled water before assembling the holders for the following filtration.

Sample Analysis

1. *Sample pretreatment*

- a. Allow the samples reach room temperature.
- b. Reduce the pH to < 2 by acidifying the sample with concentrated HCl (trace metal analysis grade) in a volume estimated as 0.1% of the sample total volume.

2. *Analysis*

- a. The conditions for the organic carbon analyzer Shimadzu TOC-V_{CSH} are as follow:

Combustion temperature	680 °C
Carrier gas	High purity oxygen
Carrier flow rate	150 mL min ⁻¹
Ozone generation, gas zero	Air from Whatman Gas Generator
Ozone flow rate	500 mL min ⁻¹
Sample sparge time	2 min
Minimum number of injections	3
Maximum number of injections	5
Number of washes	2
Standard deviation maximum	0.1
CV maximum	2%
Injection volume	100 µL

- b. For DOC and TOC, the system is calibrated using a solution of potassium hydrogen phthalate, while for TN and TDN, the system uses potassium nitrate. Both solutions are prepared in Milli-Q[®] water.
- c. Equipment's performance is verified before beginning the analysis, by using reference material (CRM). Low carbon water (LCW) also is employed to verify the operation of the apparatus.
- d. Place the samples in an auto-sampler for analysis. The run begins with a blank of Milli-Q[®] water and a CRM, followed by six samples, another blank of Milli-Q[®] water and a CRM. The sequence is repeated until all samples have been analyzed. The analysis finishes with a blank of Milli-Q[®], a CRM and a blank of Milli-Q[®] water that has not been acidified. This last blank allows verification of whether the acid used during acidification shows any sign of contamination. The blanks of Milli-Q[®] water and the CRM are used to determine the performance of the instrument during the analysis. If a problem is detected, analyze the samples again.

Calculation and Expression of Results

1. **Calculation of TOC or DOC.** Calibrate the equipment Shimadzu TOC-V_{CSH} for carbon using an analysis of 4 to 5 injections of a standard solution of potassium hydrogen phthalate prepared with Milli-Q[®] water. The instrument determines the concentration in parts per million (ppm). The following formula is used to calculate the concentration in $\mu\text{mol L}^{-1}$ of carbon corrected with the blank of the instrument:

$$\text{TOC (DOC)} = [(\text{Sample}_{(\text{ppm})} - \text{LCW}_{(\text{ppm})}) \times 83.33333] + \text{LCW value } (\mu\text{M}) \quad (1)$$

where

Sample = carbon concentration of the sample determined by the analyzer.

LCW = carbon concentration of the low carbon water determined by the analyzer.

83.33333 = conversion factor from ppm to $\mu\text{mol L}^{-1}$.

When LCW (ppm) is subtracted at the beginning of the equation, it eliminates the instrumental blank as well as the carbon content of the LCW; therefore, the carbon content of the LCW is added again (term at the end of the equation) to calculate the correct concentration of the sample.

2. **Calculation of TN or TDN.** The calibration of the instrument is similar to the one for carbon. The standard solution used is potassium nitrate prepared with Milli-Q[®] water. The instrument is calibrated in ppm and the conversion to $\mu\text{mol L}^{-1}$ is as follow:

$$\text{TN (TDN)} = \text{Sample}_{(\text{ppm})} \times 71.43 \quad (2)$$

where

Sample = nitrogen concentration of the sample determined by the analyzer.

71.43 = conversion factor from ppm to $\mu\text{mol L}^{-1}$.

There is no blank for the nitrogen system. Dissolved organic nitrogen (DON) can be calculated subtracting the inorganic nitrogen (NO_2^- , NO_3^- , NH_4^+) from the TDN determined by the analyzer.

References

Dickson, A.G.; Sabine, C.L.; Christian J.R. (Editors). (2007). Guide to Best Practices for Ocean Measurements. PICES Special Publication 3, 191 pgs.

Method 11. Determination of Particulate Carbon and Nitrogen

Eric Tappa

Introduction

This procedure describes the method for determining particulate carbon and nitrogen (PC and PN) in seawater. The PC (PN) is the total content of carbon (nitrogen) in seawater that does not pass through a filter of known porosity (0.7 μm) and therefore is retained in the filter. As the organic matter present in seawater can be found both dissolved as well as particulate matter, the particulate organic carbon (POC) and particulate organic nitrogen (PON) are defined as the organic fraction of the material retained by the filter. The procedure quantifies the amount of carbon (nitrogen) in the filter through an elemental analyzer, which uses a method of dry combustion in a helium/oxygen atmosphere in which the carbon (nitrogen) is reduced to CO_2 (N_2 gas). The results are expressed in $\mu\text{g L}^{-1}$ of carbon (nitrogen). The concentration range of the method is between 5 and 500 $\mu\text{g C L}^{-1}$ and 0.5 - 100 $\mu\text{g N L}^{-1}$. In the samples of the Cariaco Basin, the inorganic fraction is not significant; therefore, it is considered that the material retained by the filter is mainly of organic origin. The method described below is taken from Sharp (1974).

Principle of Analysis

The method for PC (PN) is based on the dry combustion (960 $^{\circ}\text{C}$) of organic and inorganic substances present in the sample in an atmosphere of pure helium in which oxygen is added as a catalyst. The gases from the combustion are carried by UHP helium into a chromatographic column where they are separated and then quantified by a thermal conductivity detector.

Interferences

1. If the objective is to establish the concentration of particle organic carbon, the inorganic carbon fraction (carbonates and bicarbonates) in the sample must be eliminated. The removal process is done by exposing the filters that contain the sample to HCl fumes (Schubert and Nielsen, 2000) in a desiccator for 24 hours where an open container with acid is placed in the lower compartment of the desiccator. Later, the filters are dried at 65 $^{\circ}\text{C}$ for 24 hours, folded inside tin discs, and stored in a desiccator until analysis.
2. The presence of organic material or oil on the filter, disks and plates can also contaminate the sample. Filters must be pre-combusted, and tin disks and petri dishes should be washed with methanol before using them. Use polyethylene gloves at all times while manipulating the filters, disks and petri dish.

Materials

1. Fiberglass filters, Whatman GF/F, 25 mm in diameter. Pre-combust filters for four hours at 450 $^{\circ}\text{C}$, then immerse in 10% HCl for 4 ½ hours then submerge in distilled water for two hours. Place filters in an oven at 70 $^{\circ}\text{C}$ over night and store in petri dishes.
2. Small petri dishes. Immerse in methanol and place in a desiccator for an hour. Put a piece of weighting paper in each dish.

3. Filtration unit and vacuum pump for sampling.
4. Dark plastic bottles of 2 L.
5. Tweezers, combusted and washed with methanol.
6. Tin disks (for filters and standards) of 30 mm in diameter. Wash with methanol and place in an oven at 60 °C for one hour.
7. Desiccators.
8. Teflon[®] tubes.
9. Funnels for 25 mm filters and 200 mL of capacity.

Equipment

1. Elemental Analyzer CHN Perkin Elmer 2400, instrument precision for carbon of 0.2% and 0.1% for nitrogen.
2. Microbalance with a precision of 0.001 g.
3. Oven (103 – 105 °C).

Reagents

1. *Helium gas*. Ultra high purity.
2. *Oxygen gas*. Ultra high purity.
3. *Cystine*. Quality reagent (29.99% C and 11.66% N).

Sampling

1. Collect samples from the Niskin in plastic dark bottles of 2 L, washing them three times with the sample before filling.
2. Filter through pre-combusted filters Whatman GF/F. Record the volume filtered. The volume filtered depends on the amount of particles in the water, which is indicated by the degree of filter saturation. In coastal waters, an average volume of 2 L is enough. If the water have a higher concentration of particles, reduce the volume up to 0.25 L. Ocean waters requires a larger volume (~ 4 L).
3. Store the filters in a pre-washed petri dish, label and freeze. Store three blank filters for each cast where samples are being collected for PC (PN).

Sample Analysis

1. *Sample pretreatment*
 - a. Place the petri dish and its filter, uncovered, in an oven at 60 °C over night to thaw and dry.
 - b. Place the filter with the sample side down on a tin disk, roll and fold the ends using two pre-combusted tweezers.
2. *Analysis*

- a. Place the filter and the tin disk in a Teflon[®] tube and compress with a Teflon[®] rod.
- b. The samples are then introduced via an autocarousel into an Elemental Analyzer PE2400 according to the manufacturer's instructions.

Analysis of Standard Solutions and Blanks

1. Blanks are analyzed to determine baseline levels of C and N. Place the blanks in tin disks, roll and fold the ends like the samples. Perform the analysis according to the procedure specified in section **Sample Analysis**.
2. Calibrate the PE 2400 with Cystine crystals as standard. Weigh the cystine (between 0.5 - 2 mg) and place it on a tin disk previously cleaned with methanol. Fold the disc and analyze according to the procedure specified in section **Sample Analysis**. Analyze three cystine standards for each cast.
3. In CARIACO, two casts are done where 19 samples are taken for PC and PN analysis; therefore, six blanks and six standards are analyzed together with the samples, 25 in total, during each run on the analyzer. There are two casts per water column profile.

Calculation and Expression of Results

A calibrating detector factor for carbon (K_C) and nitrogen (K_N) is determined (in terms of µg C and N) using the following formula:

$$K \text{ Factor}_{(C \text{ or } N)} = \frac{(A - B)}{(C * D)} \quad (1)$$

where

A = sample counts.

B = blank counts.

C = sample weight.

D = standard theoretical weight (%).

With each K factor, the values for carbon and nitrogen in the sample are determined using the following equation:

$$\mu\text{g L}^{-1} (C \text{ or } N) = \frac{(A - B)}{(\text{Factor}K_{(C \text{ or } N)} * V)} \quad (2)$$

where

V = volume of filtered water, in liters.

References

- Schubert, C.J.; Nielsen, B. (2000). "Effects of decarbonation treatments on d¹³C values in marine sediments". *Marine Chemistry*. 72: 55–59.
- Sharp, J.H. (1974). Improved analysis for "particulate" organic carbon and nitrogen from seawater. *Limnology and Oceanography*. 19: 984-989.

Method 12. Determination of Nutrients Using Continuous Flow Analysis (CFA) *Kent Fanning, Robert Masserini y Laura Lorenzoni*

Introduction

The analytical methods described follow the methodology of Louis I. Gordon, Joe C. Jennings, Jr., Andrew A. Ross and James M. Krest – “A Suggested Protocol for Continuous Flow Automated Analysis of Seawater Nutrients” (from WOCE Hydrographic Program and Joint Global Ocean Fluxes Study, Gordon *et al.*, 2000) revised by Andrew Ross in August 2000 and modified afterwards by Kent Fanning and Robert Masserini from University of South Florida Nutrient Analysis Laboratory. Methods and flow diagrams of the configurations presented here are adequate to assess nutrients such as phosphate, ammonium, nitrate, nitrite and reactive silicic acid.

Principles of Analysis

Continuous flow analysis (CFA) is an automated method for nutrients analysis in which a Technicon Autoanalyzer II equipped with a multi-channel peristaltic pump is employed. The CFA reduces the technical error since it analyses the samples and the standard solutions in a similar way, improving precision when adding reagents. The introduction of air bubbles in the sample stream segments the flow, reducing mixing of adjacent samples and enhancing mixing of the reagents. Each chemical reaction takes place within a glass spiral coil (manifold) where mixing occurs. The sample-reagent mixture reacts chemically to produce a colored compound whose light absorbance is proportional to the concentration of the species being analyzed. A photometer located at the end of the CFA system measures color absorbance.

Analytical Warnings

1. Temperature fluctuations in the laboratory can cause errors in the kinetic of the reaction that generates color in the sample. This problem is evident in silicic acid analysis. Very high temperatures lead to degassing of fluid, causing interference in the sample stream segments.
2. Nutrients samples continue degrading after freezing. Analyze as soon as possible. Do not freeze silicic acid samples; instead keep samples refrigerated.
3. Suspended matter can interfere with the result so filter the sample before storing.
4. Deionized water (DIW) is not adequate for the baseline of the system or as a “wash” between samples and standard solutions. DIW is only recommended to establish the analytical zero. Seawater or artificial seawater with low nutrient concentrations, with salinities between the ranges of salinity of the samples, must be used in order to avoid introducing noise during the analysis or alter the refraction index.
5. Maintain constant hydraulic pressure along the system in order to avoid false signals.
6. Calibrate gravimetrically at a constant temperature any plastic (polypropylene, etc.) labware used when preparing standard solutions, since temperature changes affect internal volume.
7. Exclude bubbles from the Cadmium-Copper column (Cd-Cu column).

Field Materials

1. Membrane filters (Nucleopore Track-Etch, 47 mm, or equivalent).
2. Filtration unit. Polycarbonate filter folders should be used to filter samples. Clean these by submerging in 5% HCL for 1 - 2 hours and rinsing several times with distilled water.
3. Vacuum pump.
4. Polyethylene bottles (250 mL) and high density polyethylene bottles (HDPE, 30 mL). Clean by submerging in 10% HCl all night and rinsing several times with distilled water.

Laboratory Materials

1. Glass bottles calibrated gravimetrically (NIST quality Class A or equivalent).
2. Pipettes (Eppendorf Maxipettor, Lab Industries Standard REPIPET, and precision 0.1%).

Equipment

1. Technicon Autoanalyzer II (AA-II) or an Astoria-Pacific International analyzer (former Alpkem) series 300 or RFA-2.
2. Peristaltic pump.
3. Analytical package including injection system, mixing coils, and water bath.
4. System structure. Follow Gordon *et al.* (2000) specifications (Figure 12.1).

Sampling

1. The interior of the Niskin bottles and the valves must be free of any inorganic or organic residue, as well as of any sign of corrosion. Replace any oxidized component and clean the interior of the bottles with 8M HCl.
2. Samples are collected in 250 mL polyethylene bottles. Rinse three times with the sample. Fill the bottle about $\frac{3}{4}$ full; try not to touch the cap or the bottle mouth with the fingers since fingerprints contaminate the sample with phosphates.
3. Filter the sample through a Nucleopore filter directly into a HDPE bottle, after rinsing three times with filtered water. Change the filter every four samples.
4. Fill the bottle to $\frac{3}{4}$ its volume, wipe the cap and the mouth of the bottle with a paper towel that does not release fibers and replace the cap firmly. Freeze immediately to temperatures below $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Keep the bottles vertically so they do not turn over and loose the brine. During the freezing process a brine forms which can be lost if the cap is not firmly tight. Lost of this brine can produce important errors.
5. Before the analysis, defrost the samples for a period of 15 minutes using a water bath. Mix before opening the bottle to guarantee a homogenous sample.
6. Silicic acid samples are filtered but not frozen. Store at $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ keeping the bottles vertically in a rack so they do not over-turn.

Preparation of Deionized Water, Low Nutrient Seawater, and Standard Solution

Deionized water (DIW) and Low Nutrient Seawater (LNSW)

Follow Gordon *et al.* (2000) specifications for DIW and LNSW used for reagents, standard preparation and analytical zero.

Preparation of Standard Solutions

The calculations of molar concentrations used here come from compiled tables from Weast *et al.* (1985, pp. D-232 y D-262). Write down the date and hour of standard preparation as well as the date of initial use.

Standard solutions used during the analysis are of three types: A, B and C.

- ***Standard A.*** Stock solution from which standard solutions B and C are prepared. Therefore, it is fundamental to use analytical grade reagents for standard A.
- ***Standard B.*** Standard solution prepared from the stock solution.
- ***Standard C.*** Working solutions introduced directly into the CFA for calibration (prepared with LNSW and standard B). Three standard C solutions with different concentrations are prepared.

Prepare two standards A and measure both in the AA-II. The maximum absorbance of both standard solutions must be identical; otherwise, prepare a third standard A and continue until two solutions have the same maximum absorbance.

Ground carefully analytical reagents in crystal form in a mortar. Dry each reagent in an oven to 105 °C for 48 hours and place in a vacuum desiccator with BaO or MgSO₄ for another 48 hours. Allow the reagents reach room temperature before weighing.

- a. ***Standard A phosphate and nitrate solutions (2,500 μM HPO₄²⁻ and 37,500 μM NO₃⁻).*** Weigh 0.3402 g anhydrous potassium dihydrogen phosphate (KH₂PO₄; Fisher Scientific no. P382-500) and 3.7912 g potassium nitrate (KNO₃; Fisher Scientific no. P383-500). Transfer to two 1000 mL volumetric flasks (one for each reagent). Dissolve solids in DIW and dilute to 1 L.
- b. ***Standard A nitrite solution (2,000 μM NO₂⁻).*** Weigh 0.1380 g of sodium nitrite (NaNO₂; Fisher Scientific no. S347-500) with a 97-98% degree of purity and transfer to a 1000 mL volumetric flask. Dissolve in DIW and dilute to 1 L.
- c. ***Standard A ammonium solution (30,000 μM NH₄⁺).*** Weigh 1.6037 g of ammonium chloride (NH₄Cl, 99% purity, Sigma Aldrich no. 32,637-2) and transfer to a 1000 mL volumetric flask. Dissolve in DIW and dilute to 1 L.
- d. ***Standard A silicic acid (20,000 μM SiOH₄).***
 - i. Transfer 2 g of SiO₂ analytical grade to a platinum crucible and place in a burner for 5 minutes. Place the crucible in a desiccator and let it reach room temperature.
 - ii. Weigh 0.6008 g of dry SiO₂ and place in the platinum crucible.
 - iii. Weigh separately 4 g of sodium carbonate (Na₂CO₃) and place on the SiO₂ (Figure 12.2A).
 - iv. Cover the crucible and place on the burner in an angle (Figure 12.2B).

- v. Keep away from the blue flame and heat until a cracking sound occurs. Remove from the burner. Replace the crucible on the burner and heat until you hear the sound again. Repeat these steps until the sound stops. At this point, heat for 20 more minutes.
 - vi. Remove from the burner and let the crucible cool down.
 - vii. Transfer (with a spatula and DIW) the melted silica disk to a Teflon[®] beaker. Allow the disk to dissolve (about 30-45 minutes).
 - viii. Transfer the silica solution to a 500 mL volumetric flask and dilute with DIW. Work fast in order to avoid contamination from the glass. If more than 500 mL is needed, prepare two solutions of 500 mL and mix.
 - ix. Adjust the pH of the solution to 9.5 using 10% HCl.
 - x. Keep in a polyethylene bottle (never use glass) at room temperature. Never refrigerate since precipitation may occur due to the change of temperature.
- e. **Standard B for phosphate and nitrate ($75 \mu\text{M HPO}_4^{2-}$ and $375 \mu\text{M NO}_3^-$).** Transfer 30 mL of phosphate standard A and 10 mL of nitrate standard A to a 1000 mL volumetric flask. Dilute to 1 L with DIW.
 - f. **Standard B silicic acid ($2,000 \mu\text{M SiOH}_4$).** Transfer 100 mL of standard A silicic acid to a 1000 mL volumetric flask. Dilute to 1 L with DIW.
 - g. **IT IS NOT NECESSARY TO PREPARE A STANDARD B FOR AMMONIUM AND NITRITE, SINCE STANDARD A FOR BOTH IS DILUTED ENOUGH.**
 - h. **Working standard C solutions.** Prepare three different concentrations of standard C for each nutrient to be analyzed (C1 – C4, being C4 the highest concentration and C1 the LNSW blank). Table 12.1 indicates the volume from standard B (or A in case of ammonium and nitrite) that must be transferred to a 250 mL volumetric flask to make working solutions C2-C4. Dilute standard solutions A and B with LNSW in different proportions to make working solutions. The dilutions given in this manual are adequate for upwelling waters where anoxia is present. For other systems, adjust the dilutions according to the nutrient concentration range.
 - i. **Surfactant agents.** High purity dodecyl sodium sulfate ($\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{11}\text{OSO}_3\text{Na}$) is used for the silicic acid and phosphate method, and Brij-35 is used for nitrate-nitrite analysis.

Nutrient Analysis

The following section gives details about the methods employed for nutrient analysis when using an AA-II. Maintain a regular pattern of bubbles, necessary for noiseless signals, by cleaning the flow channels daily with a solution of 1.2M HCl (10% HCl). Use DIW to rinse all tubes. Occasionally, wash with 2.5 M NaOH. Purge the reagents out of the system, so that they do not precipitate with the acids or bases used for washing. If the pattern of bubbles is interrupted, wash all the system and do not reinitiate immediately. The peristaltic pump and the air bar generate the segmented flow.

Phosphate

This procedure describes the method for the determination of phosphate in seawater using a modification of the procedure of Bernhardt and Wilhelms (1967). The results are expressed in μM of HPO_4^{2-} . The flow diagrams for the AA-II are in Figure 12.3. For this system, flow

cells of 5 cm and S1 phototubes of high rank are used. This method has a linear response of up to 5.0 μM HPO_4^{2-} .

Principles of Analysis

The dissolved orthophosphate ions (H_2PO_4 , HPO_4^{2-} and PO_4^{3-}) in seawater react with the ammonium molybdate under acid conditions to form a complex compound (molybdophosphoric acid). The resulting complex is reduced when hydrazine sulphate is added forming a solution of an intense blue color. The flow of the sample in the autoanalyzer is heated to accelerate the reaction.

Reagents

Follow Gordon *et al.* (2000) instructions for the preparation of reagents.

Nitrate + nitrite

This procedure describes the method for nitrate + nitrite determination in seawater using a modification of Armstrong *et al.* (1967). The results are expressed in μM of $\text{NO}_3^- + \text{NO}_2^-$. The flow charts for this analysis are in Figure 12.4.

Principles of Analysis

The nitrate present in the sample is almost quantitatively (> 95%) reduced to nitrite ions when the samples pass through a Cd-Cu column. These nitrite ions represent the reduced nitrate plus any original nitrite ions. These ions react in an acid solution with two aromatic amines (sulfanilamide and N-(1-naftil) - ethylenediamine dihydrochloride) to form a reddish colored azo dye. The difference between the nitrite concentration in a reduced sample and the concentration in a non-reduced sample represents the concentration of nitrate.

Reagents

Follow Gordon *et al.* (2000) instructions for the preparation of reagents and Cd-Cu column. Figure 12.5 shows the Cd-Cu column appropriate for an AA-II where:

- | | |
|--|--|
| 1 = Teflón [®] tube (internal diameter 1mm) | 5 = glass wool cork |
| 2 = Tygon [®] tubing | 6 = Cd-Cu filings |
| 3 = connection Technicon N-6 | 7 = glass tube (external diameter ~1/4", 3" length). |
| 4 = Tygon [®] tubing (1/4") | |

Nitrite

This analysis is performed in a separate channel using the method for nitrate + nitrite but without neither the reduction column nor the Imidazole solution. Figure 12.6 shows the flow chart of the nitrite system. The reagents for this analysis are the same described for the nitrate analysis. The sensitivity of this analysis is approximately 0.056 AU/ μM nitrite. The results are expressed in μM of NO_2^- .

Silicic acid

This procedure describes the method for silicic acid determination in seawater using the procedure of Armstrong *et al.* (1967) adapted by Atlas *et al.* (1971). Figure 12.7 shows the flow chart for the silicic acid system. This method is accurate enough to measure silicic acid in oceanic water (blue waters). The results are expressed in μM of $\text{Si}(\text{OH})_4$.

Principles of Analysis

When adding molybdic acid to the sample, a complex, named β -silicomolybdic acid, is formed, due to the reaction between ammonium molybdate in an acid solution and the silicic acid that the sample contains. When adding stannous chloride this complex is reduced to a blue color. The color development is sensitive to temperature fluctuations; therefore, the manifold should be protected from air drafts, and the temperature in the manifold should be controlled during the analysis (Knap *et al.*, 1997).

Reagents

Follow Gordon *et al.* (2000) instructions for the preparation of reagents.

Ammonia

From Gordon *et al.* (2000), the ammonia determination as described is modified from a method ALPKEM FRG, taken from "Methods for Chemical Analysis of Water and Wastewater", March 1984, EPA-600/4-79-020, "Nitrogen Ammonia", Method 350.1 (Colorimetric, Automated Phenate). The flow chart for this method is in Figure 12.8. The AA-II uses a flow cell of 50 mm, interference filters of 640 nm and Technicon S-10 phototubes. This method is linear at least until 6 μM . Analytical sensitivity is 0.022 AU/ μM ammonium.

Principles of Analysis

The ammonium in the sample reacts with alkaline phenol in the presence of sodium hypochlorite as an oxidizing agent to form the complex blue indophenol. Due to the high pH, a complexing agent is used to remove the excess of magnesium ions that form during the reaction and interfere in the analysis.

Reagents

Follow Gordon *et al.* (2000) instructions for the preparation of reagents.

Sample Analysis

A summary of the steps to follow in order to run seawater samples through the CFA system is given below.

1. *Start the equipment and establish the baseline*

- a. Check the levels of DIW and “wash” solutions (DIW and surfactants) in the bottles and fill as needed.
- b. Start pumping and purge the system at least for 10 minutes. The longer the purge, the better the run will be.
- c. While purging, check the volume of all the reagents and fill as needed. Prepare new working solutions.
- d. Assure a constant airflow and the presence of bubbles in the flow system. This guarantees a suitable purge of the air from the system.
- e. Once the purge is finalized, check the voltage scales (zero and maximum, 5V FS) in the equipment and adjust them as needed.
- f. Add the reagents by moving the reagent tubes from the washing bottles to the corresponding reagent bottles.

NOTE. In the silicic acid channel, it is necessary to wait at least 5 minutes before adding the SnCl_2 after the addition of the tartaric acid and molybdate solutions. A premature addition of the SnCl_2 can lead to the formation of a dark blue precipitate on the walls of the tubes and mixing coils. If this happens, purge the system with NaOH to dissolve and remove the precipitate.

- g. It is important to assure the purge of all the system with buffer solution (Imidazole) before introducing the Cd-Cu column. Usually this solution runs throughout the system for 3 to 5 minutes after the pumping begins.
- h. Changes in the baseline of the detector are observed when the reagents reach the colorimeters. At this point, write down the difference (in graph units) between the original baseline, using DIW, and the new baseline using the reagents. This difference must be consistent day after day, and is a good mechanism to confirm the correct operation of the system (the opposite indicates deterioration of the reagents or a change in the calibration of the colorimeters).
- i. Allow the instrument to register the new baseline for 10-20 graph units until obtaining a stable baseline where irregular changes can be observed. If the baseline has noise, check that there are not bubbles clogged within the system. Usually pinching the tube at the exit flow of the cell within the colorimeter for several seconds solves the problem.
- j. If the baseline does not display noise, start running the samples. Place the washing tube (that fills the autosampler) in the LNSW. Observe the detector and wait for the change of signal that indicates that the LNSW is flowing through the system and has reached the colorimeters (around 20 minutes).

NOTE. It is important to label properly the bottles corresponding to each working standard and to the DIW, to avoid confusion at the time of the run.

2. *Sample run*

- a. Run working standards before and between samples. The run of standards and samples consist of:
 - A run of the working standard C4.
 - Two runs of the standard C1 (LNSW).
 - Three runs of the working standards C4.
 - Three runs of the working standards C3.
 - Three runs of the working standards C2.
 - Three runs of the standard C1 (LNSW).
 - Three wash with DIW.
 - Run of the first group of seawater samples, running the first sample two times.
 - After 12 samples, run the baseline with LNSW, to verify that the drift of the equipment is less than two graph units.
 - Run the rest of the samples, repeating the baseline of LNSW after every 12 samples (if it is necessary).
 - A run of LNSW.
 - Three wash with DIW.
 - Three runs with standard C1 (LNSW).
 - Three runs with the working standard C2.
 - Three runs with the working standard C3.
 - Three runs with the working standard C4.
 - Allow the baseline to run for 5 minutes.

NOTE. A run of more than 12 samples usually takes several hours. There is a delay between the time at which the sample is introduced to the system and the time it takes the colorimeter to detect a peak (for ammonium, the lag time can be of up to 20 minutes). Allow the run of the baseline for 5 minutes before initiating a second run or culminating the present one.

During the run, air bubbles must have a regular pattern. Check for noise or sudden changes in the measurements of the colorimeter in the detector, as well as in the extractor tube. The extractor tube must take the sample correctly from each bottle, and care should be taken to avoid wrong positioning or movement of the bottles on the carousel, which can affect the procedure. Verify the levels of the reagents during a run.

In order to avoid the drift of the instruments, the runs for a set of samples must be brief, so that the time that passes between the beginning and the end does not exceed 90 minutes.

3. *Purging and turning off the system*

- a. Once the baseline has run for 5 minutes at the end of a series of measurements, it is possible to begin to wash the system and turn it off. The “wash” is fundamental to avoid the formation of precipitates in the walls of the tubes and mixing coils of the system.

- b. Turn off the detector and close the data acquisition program.
- c. Carefully remove the Cd-Cu column from the system, trying not to introduce air within the column while doing it.
- d. Remove all the reagents, except tartaric acid, and place all the tubes in their respective “wash” recipients. Once the SnCl₂ is purged completely from the system, place the tube of tartaric acid in its “wash” recipient.
- e. Using the autosampler, run two bottles with 10% HCl, two bottles with NaOH 1M and two bottles with 10% HCl through all the system.
- f. Purge the system with DIW for about 10-15 minutes before turning off the pump.

Calculation and Expression of Results

For calculations and expression of results, see Gordon *et al.* (2000).

References

- Armstrong, F.A.J.; Stearns, C.R.; Strickland, J.D.H.. (1967). The measurement of upwelling and subsequent biological processes by means of the Technicon_AutoAnalyzer and associated equipment. *Deep-Sea Research*. 14(3): 381-389.
- Atlas, E.L.; Hager, S.W.; Gordon, L.I.; Park, P.K. (1971). A practical manual for use of the Technicon_ Autoanalyzer_ in seawater nutrient analyses; revised. Technical Report 215. Oregon State University, Dept of Oceanography, Ref. No. 71-22. 48 pp.
- Bernhardt, H.; Wilhelms, A.. (1967). The continuous determination of low level iron, soluble phosphate and total phosphate with the AutoAnalyzer. *Technicon Symp*, Vol. I, p. 386.
- Gordon L.I.; Jennings Jr, J.C.; Ross, A.A.; Krest, J.M. (2000). A Suggested Protocol For Continuous Flow Automated Analysis of Seawater Nutrients. En: WOCE Operation Manual, WHP Office Rept 90-1, WOCE Rept 77 No 68/91, 1-52.
- Knap, A.H.; Michaels, A. F.; Steinberg, D.; Bahr, F.; Bates, N.; Bell, S.; Countway, P.; Close, A.; Doyle, A.; Dow, R.L.; Howse, F.; Gundersen, K.; Johnson, R.; Kelly, R.; Little, R.; Orcutt, K.; Parsons, R.; Rathbun, C.; Sanderson, M.; Stone, S. (1997). BATS methods manual. Version 4. U.S. JGOFS Planning Office, Woods Hole, 136 pgs.
- Weast, R.C.; Astle, M.J.; Beyer, W.H. Eds. (1985). CRC Handbook of Chemistry and Physics. 66th. edition.

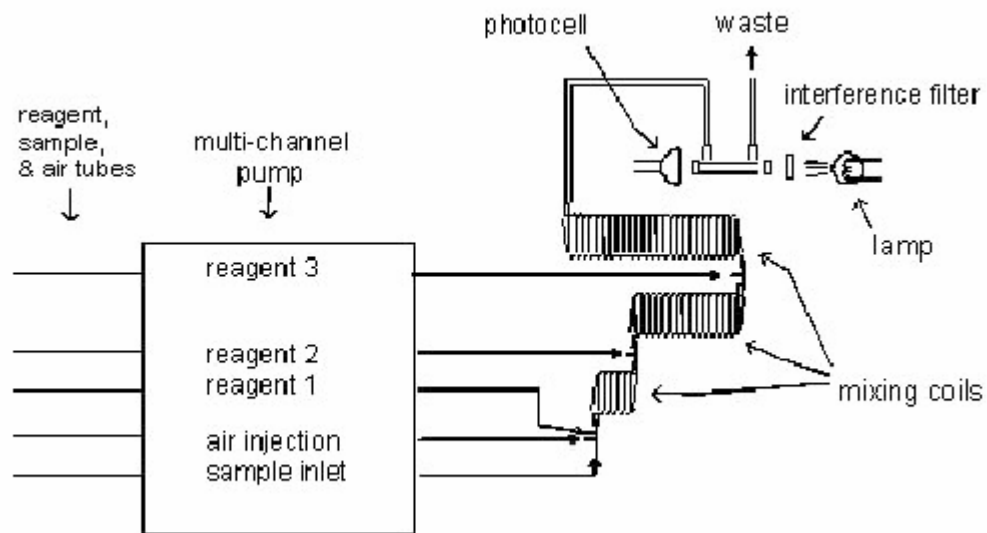
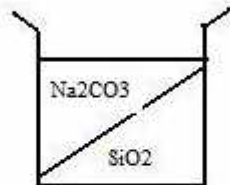


Figure 12.1. Main components of a CFA system. Reproduced from Gordon *et al.* (2000) by permission.

A



B

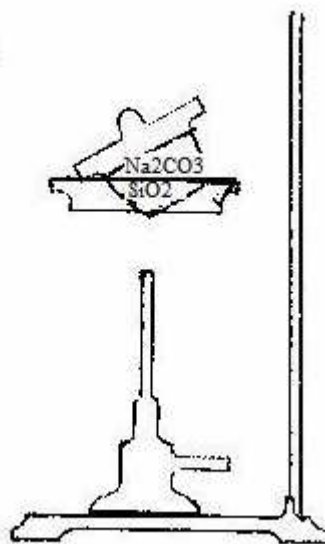


Figure 12.2. Scheme for the preparation of silicic acid standard

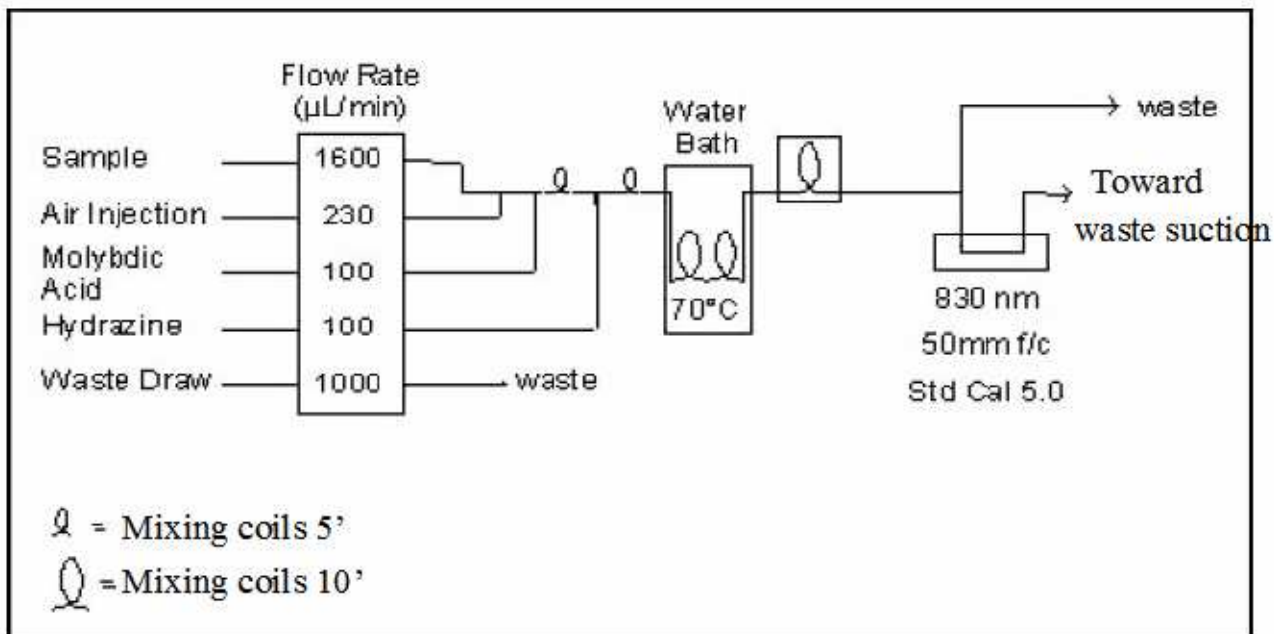


Figure 12.3. Flow diagram for phosphate system. Reproduced from Gordon *et al.* (2000) by permission.

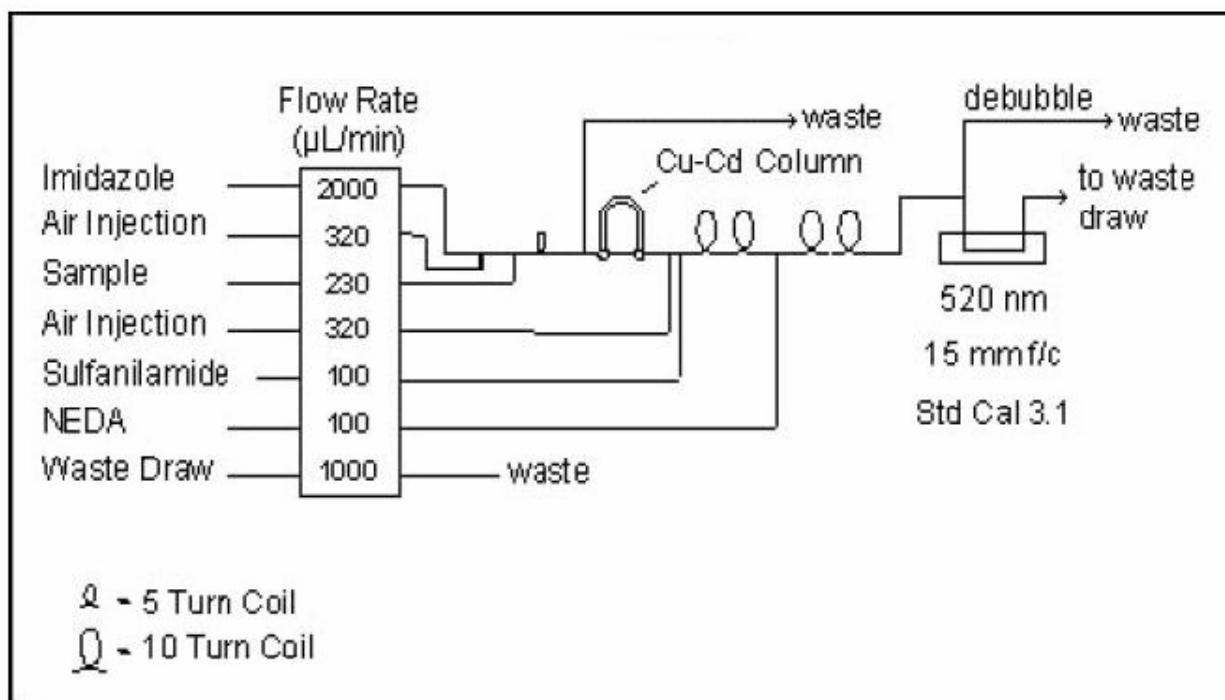


Figure 12.4. Flow diagram for the nitrate system. Reproduced from Gordon *et al.* (2000) by permission.

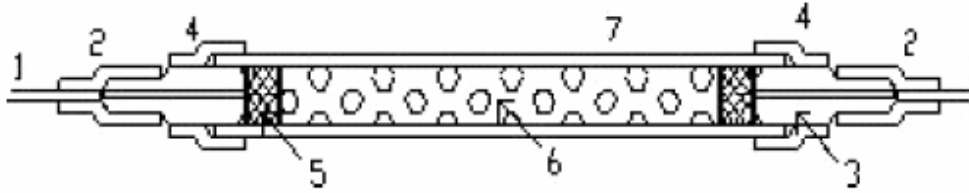


Figure 12.5. Cd-Cu column to use in an AA-II. Reproduced from Gordon *et al.* (2000) by permission.

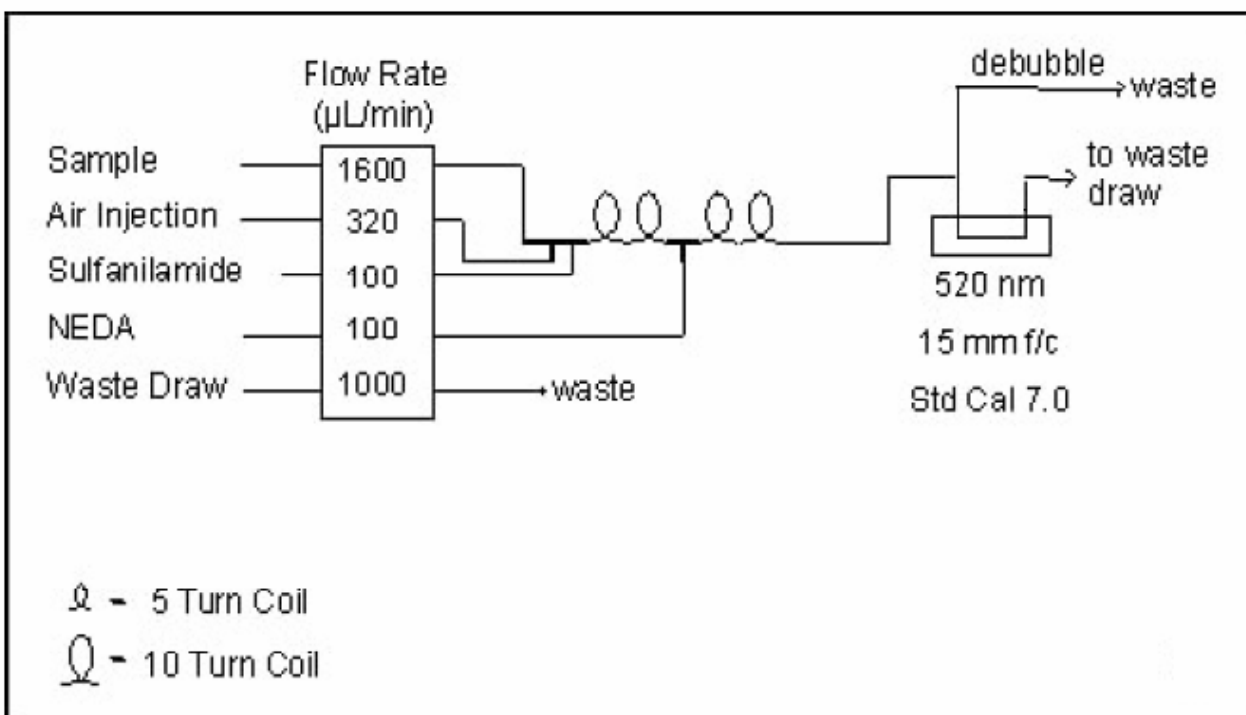


Figure 12.6. Flow diagram for the nitrite system. Reproduced from Gordon *et al.* (2000) by permission.

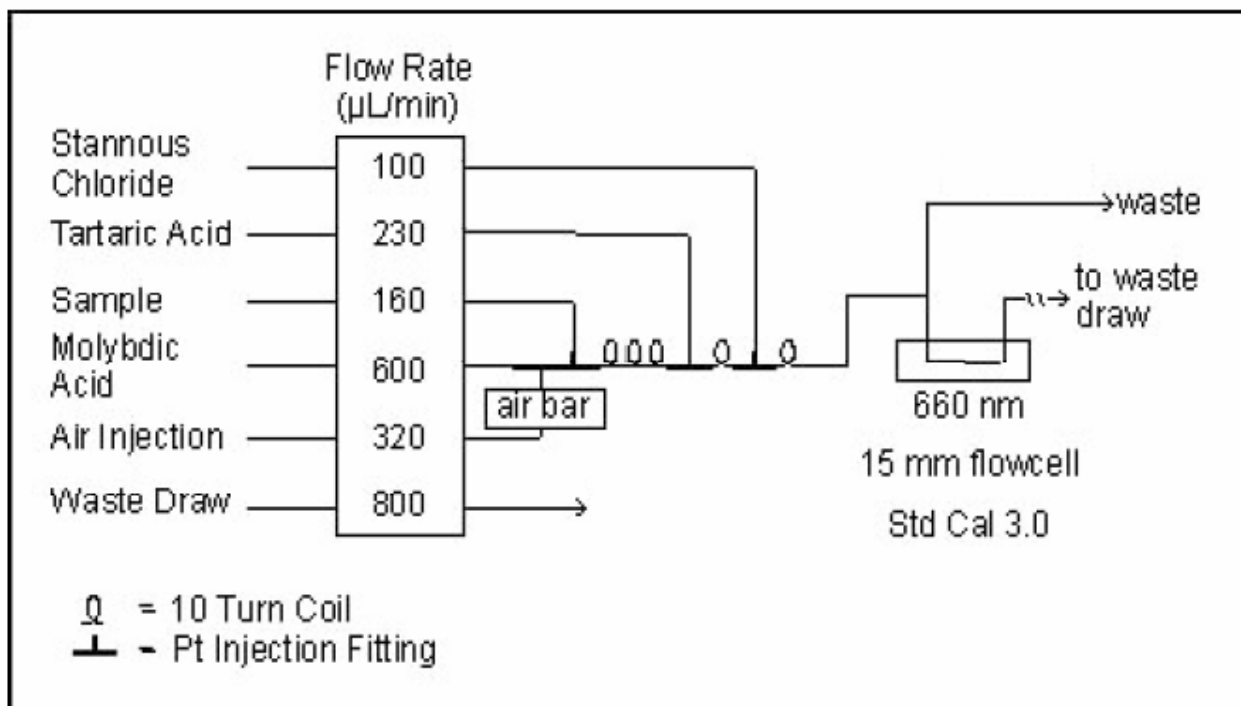


Figure 12.7. Flow diagram for the silicate system. Reproduced from Gordon *et al.* (2000) by permission.

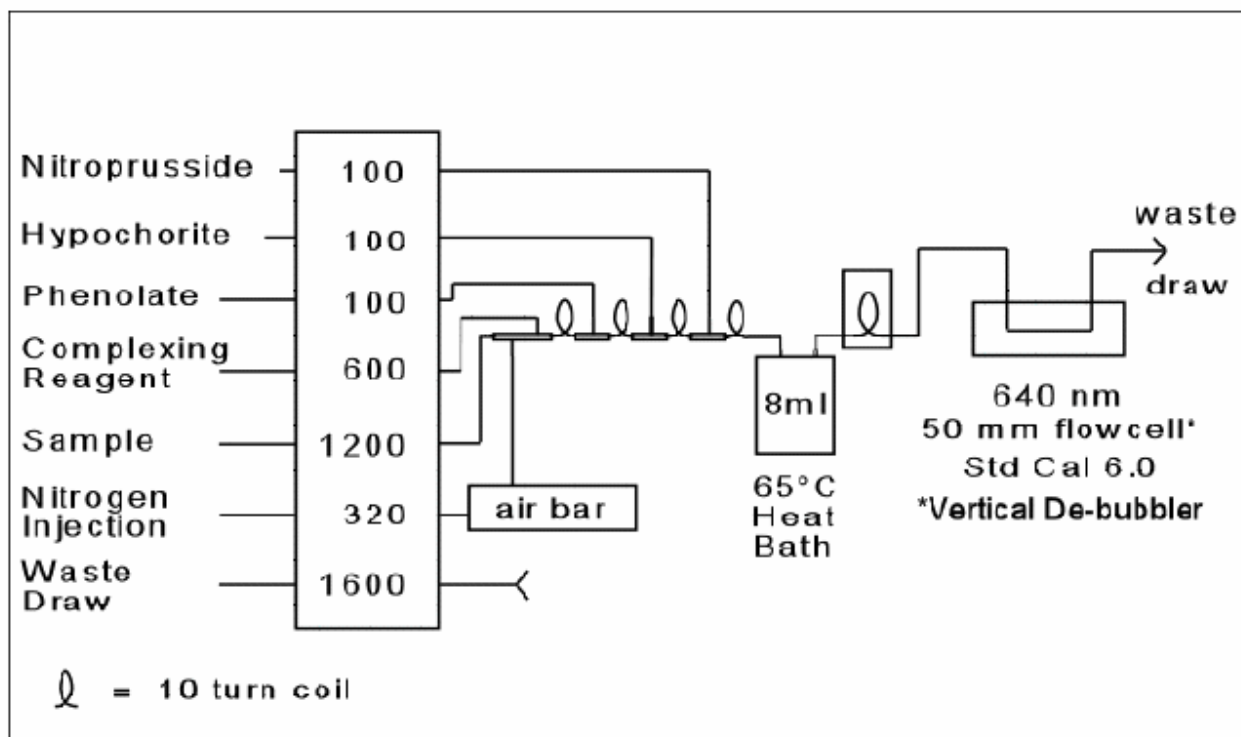


Figure 12.8. Flow diagram for the ammonia system. Reproduced from Gordon *et al.* (2000) by permission.

Table 12.1: Volume of standard B (or A in case of ammonia and nitrite) to prepare standard solutions C. LNSW is low nutrient seawater.

Nutrients	Phosphate	Nitrate	Silicic acid	Nitrite	Ammonia
Standard solutions					
C4	15 mL	15 mL	10 mL	0.25 mL	0.25 mL
C3	10 mL	10 mL	5 mL	0.1 mL	0.1 mL
C2	5 mL	5 mL	2.5 mL	0.05 mL	0.05 mL
C1	LNSW	LNSW	LNSW	LNSW	LNSW

Method 13. Determination of Chlorophyll *a* and Phaeopigments

Ramón Varela

Introduction

The determination of chlorophyll *a* is used as an indicator of the biomass of the primary producers (phytoplankton) that are found as suspended particles in the water. The following procedure quantifies the chlorophyll concentration and phaeopigments found in a sample using fluorometric techniques. The procedure follows Holm-Hansen *et al.* (1965), and the calculations are done as indicated in Lorenzen (1966). Among the modifications are the use of methanol instead of acetone as an extraction solvent due to its greater efficiency (Holm-Hansen and Riemann, 1978) and the use of a sonic dismembrator (Wright *et al.*, 1997). The method applies to all ranges of chlorophyll *a* concentration found in seawater. The method detection limit is $0.01 \mu\text{g L}^{-1}$ for natural waters (for a 0.5 L sample). The results are expressed in $\mu\text{g L}^{-1}$ or mg m^{-3} .

Principles of Analysis

A seawater sample is filtered through a fiberglass filter on which suspended particles are retained. Among these particles, there is chlorophyll bearing organisms. Algal pigments are extracted using methanol as the solvent and a sonic dismembrator is used to break the filter and the cells. After clarifying the extract by centrifugation, algal pigments are excited by light, which has a blue wavelength, emitting fluorescence with a red wavelength. The fluorescence is detected by a photomultiplier. Next, the sample is acidified to convert all the chlorophyll *a* into phaeopigments and is measured again in the fluorometer.

Interferences

1. The presence of chlorophyll *b*, chlorophyll *c* and/or divinyl chlorophyll *a* in the sample can cause error in the measurement. High chlorophyll *b* concentrations, especially at the depth of the chlorophyll maximum, have a negative interference with chlorophyll *a*, and a positive one with phaeopigments (Knap *et al.*, 1997). This interference is important if algae of the class Chlorophyceae and Prochlorophyceae are abundant.
2. The detection limit of the equipment is exceeded when the level of pigments in the extract is very high. The fluorometer is always kept at maximum sensitivity; therefore, the measurements tend to underestimate high concentrations, possibly because of quenching. In order to solve this problem, several alternatives exist. One alternative, not recommended, is to dilute the sample, which increases the uncertainty of the method. If the filter is saturated after filtration, one option is to cut the filter into smaller fractions and analyze separately. The most recommended option in very productive waters with high concentration of phytoplankton is to filter a smaller volume of water (250 mL or less) to avoid cutting the filter or diluting the sample.
3. Fluorescence depends on temperature; therefore, perform the calibration of the equipment as well as analysis of samples at a constant ambient temperature between 20-25 °C. The temperature coefficient for the fluorescence of chlorophyll is $-0.3\%/^{\circ}\text{C}$.
4. Chlorophyll degrades quickly under intense light; perform the analysis under dimmed light.

5. Materials used during the analysis as well as the methanol must remain free of acid residues.

Materials

1. Fiberglass filters (Whatman grade GF/F or equivalent, 0.7 μm pore size, 25 mm diameter).
2. Funnels for 25 mm filters, 200 mL capacity.
3. Polypropylene graduated centrifuge tubes with screw caps for extraction, 15 mL.
4. Cells, 13-mm, specific for the fluorometer.
5. Automatic pipettes with capacity of 200 and 1000 μL .
6. Volumetric pipettes (5 and 10 mL).
7. Small spatulas.
8. Vinyl gloves.

Equipment

1. Fluorometer Turner Designs, with a photomultiplier sensitive to the red wavelength (λ 185-870 nm), lamp F4T5D (10-AU-005), blue filter (λ 340 – 500 nm CS 5-60) and red filter (λ > 665 nm CS 2-64).
2. Sonic dismembrator, Fisher Scientific model 100.
3. Centrifuge, 0 - 3900 r.p.m.
4. Filtration unit and vacuum pump.

Reagents

1. **Methanol** (CH_3OH).
2. **Hydrochloric acid** (0.48N HCl).
3. **Concentrated chlorophyll a solution.** An ampoule of commercially available pure chlorophyll *a* standard solution is used (*Anacystis nidulans* C-6144 Sigma, 1 mg) free of chlorophyll *b*. Dissolve the content of an ampoule filled with chlorophyll *a* crystals in 15 mL of methanol. Chlorophyll crystals dissolve very slowly; therefore, make the dilution two days before the calibration. Once dissolved, keep this solution frozen at - 20 °C.
4. **Working solution for calibration.** Dilute 1 mL of the concentrated chlorophyll *a* solution in 49 mL of methanol. The concentration of this solution must be approximately 1 $\mu\text{g L}^{-1}$. In order to determine the precise concentration, measure the absorption for each nanometer between 660 and 670 nm using a recently calibrated spectrophotometer and locate the wavelength of the maximum absorption (A_{max}). Determine the chlorophyll concentration in the solution applying the following formula:

$$\text{Chlorophyll } a = \left[\frac{(A_{\text{max}} - A_{750\text{nm}})}{E * L} \right] * \frac{1000\text{mg}}{1\text{g}} \quad (1)$$

where

A_{max} = maximum absorption (between 660 - 670 nm).

$A_{750\text{nm}}$ = absorbance at 750 nm.

E = chlorophyll specific absorption coefficient in methanol, 79.81 $\text{g}^{-1} \text{cm}^{-1}$ (Jeffrey and Welschmeyer, 1997).

L = cell pathlength in cm, 10-cm.

Cleaning Procedures

Soak all the glass material (cells, pipettes, etc.) in a 10% HCl solution for 24 hours. Rinse five times with distilled water and let them dry. Keep the fluorometer cells upside down to avoid dust particles inside the cell. Wash the tweezers, spatulas, and any other material that is not made of glass with liquid detergent, running water and a final rinse with distilled water. Wear gloves all the time.

Sampling

1. Collect the water samples in 1 L polyethylene dark bottles rinsing three times with the sample before filling.
2. Filter the sample immediately through a fiberglass filter. Register the filtered volume. The volume to filter depends on the amount of chlorophyll that is found in the water, which can be estimated through the CTD fluorometer. In waters with low biomass ($< 1 \text{ mg m}^{-3}$), filter a volume of 500 mL in duplicate. If the biomass is $> 1 \text{ mg m}^{-3}$, filter 250 mL in triplicate.
3. Maintain vacuum levels less than 100 mm Hg to avoid breaking the cells.
4. When filtration is finished, remove the filter with a flat tweezers and fold in half or roll up with the side that contains particles inwards. Place in a centrifuge tube properly identified.
5. Freeze at $-20 \text{ }^{\circ}\text{C}$. Analyze within a month.

Blank Analysis

Before beginning the chlorophyll *a* analysis, it is essential to evaluate the operation of the fluorometer as well as the analytical quality of the methanol with a blank analysis. The methanol must be free of polluting agents or of some other contaminant that can alter the results.

1. Place 5 mL of methanol with a clean pipette in a fluorometer cell.
2. Make a reading in the fluorometer. An indication of possible contamination of the reagent or uncalibrated equipment is a reading greater than zero; therefore, **DO NOT** make the analysis until the equipment is calibrated or after changing the reagent.
3. It is convenient to use a solid standard provided by the manufacturer to verify the stability of the equipment before the analysis. This standard is adjusted during the calibration.

Sample Analysis

It is recommended to begin the analysis with samples with lower concentrations and finish with the ones with greater concentration (usually surface samples). Analyze duplicates simultaneously. Wear gloves all the time during the analysis and follow safety procedures for handling methanol.

1. *Sample preparation before the analysis. Sonication.*
 - a. Remove the centrifuge tubes from the freezer, and let the filters reach room temperature protected from light.

- b. Filters are extracted in 10 mL of pure methanol. Verify that all the tubes contain the same amount of liquid and that the filters are totally submerged.
- c. Grind each filter within its tube with a small spatula to homogenize the sample. Homogenization by grinding of the filter enhances the rupture of the algal cells and increases extraction efficiency of the solvent. Put the tubes in a test tube rack and cover with aluminum foil to protect the tubes from light.
- d. Lower the sonic dismembrator into the methanol of each tube until it is 4.5 cm above from the bottom of the tube. The probe must be as perpendicular as possible and it must not touch the walls of the centrifuge tube.
- e. Turn on the dismembrator and gradually increase the power until position 15.
- f. Sonicate for 30 seconds, turn off the equipment and remove the dismembrator, put the centrifuge tube cap on, and store the sample protected from light.
- g. Rinse the tip of the dismembrator with pure methanol between samples and let it dry.
- h. Place the tubes in a rack and store at 4 °C (do not freeze) for 24 hours to allow methanol to extract the pigments. It is recommended to shake slightly the tubes three or four times during this period.

2. *Measurement of chlorophyll a and phaeopigments with a fluorometer*

Turn on the fluorometer one hour before beginning the analysis to allow the equipment to stabilize.

- a. Place the tubes in a centrifuge for 30 min at 3000 r.p.m. to clarify the extract.
- b. Transfer the tubes to a rack and arrange duplicates together, protecting them from light.
- c. With a pipette, carefully withdraw 5 mL of methanol from the upper portion of the liquid in the tube, without touching particles of the filter or producing turbulence. Add to a fluorometer cell.
- d. Place the cell in a previously calibrated fluorometer, and make the reading once the equipment stabilizes (~ 8 s). This reading corresponds to the initial fluorescence (F_0).
- e. Add 100 μL of 0.48N HCl and shake slightly. Wait at least three minutes to complete the reaction.
- f. Place the cell in the fluorometer and once it stabilizes, make the reading of the acidified sample. This reading corresponds to the acidified fluorescence (F_a).
- g. Between samples, rinse the pipette and the fluorometer cells a minimum of three times with pure methanol.

Fluorometer Calibration

Calibrate the fluorometer every six months with a pure, commercially available chlorophyll standard (*Anacystis nidulans* C-6144 Sigma, 1 mg) free of chlorophyll *b*. Follow the instructions of the manufacturer. Make five dilutions of the working solution of chlorophyll, with concentrations between 0 and 130 $\mu\text{g L}^{-1}$, which allows calibrating the equipment for a scale of 0 to 150 $\mu\text{g L}^{-1}$. Once calibration is finalized, measure the solid standard that is provided by the manufacturer, and use this reading to verify the stability of the equipment in successive analyses. A drift greater than 10% indicates the necessity of a new calibration.

The same dilutions can be used to determine the acidification coefficient (R) after calibration. Take the readings from several dilutions (Fo), then acidify with 100 µL of 0.48N HCl. Measure samples again in the fluorometer (Fa_{max}). R is the maximum fluorescence ratio, before and after acidifying, calculated from the chlorophyll standard *a* (C-6144 Sigma) used to calibrate the fluorometer. For methanol, R varies between 2.4 and 2.7. The value of R for methanol is more variable than the one used for acetone. The amount of acid added to the cell must be the same for the calibration as well as for the samples. A small increase in the volume produces anomalous values of R.

$$R = \left(\frac{F_o}{F_{a_{\max}}} \right) \quad (2)$$

where

F_{o_{max}} = reading before acidification.

F_{a_{max}} = maximum fluorescence after acidification.

Calculation and Expression of Results

The Lorenzen formula (1966) used to calculate the chlorophyll *a* concentration and phaeopigments in seawater is:

$$\text{Chlorophyll } a \text{ (}\mu\text{g L}^{-1}\text{)} = \left[\frac{R}{(R-1)} \right] * (F_o - F_a) * \left(\frac{V_m}{V_s} \right) \quad (3)$$

$$\text{Phaeopigments (}\mu\text{g L}^{-1}\text{)} = \left[\frac{R}{(R-1)} \right] * ((R * F_a) - F_o) * \left(\frac{V_m}{V_s} \right) \quad (4)$$

where

V_m = volume of methanol (50 mL).

V_s = volume of filtered sample.

F_o = reading before acidification.

F_a = reading after acidification.

References

- Knap, A.H.; Michaels, A. F.; Steinberg, D.; Bahr, F.; Bates, N.; Bell, S.; Countway, P.; Close, A.; Doyle, A.; Dow, R.L.; Howse, F.; Gundersen, K.; Johnson, R.; Kelly, R.; Little, R.; Orcutt, K.; Parsons, R.; Rathbun, C.; Sanderson, M.; Stone, S. (1997). BATS methods manual. Version 4. U.S. JGOFS Planning Office, Woods Hole, 136 pgs.
- Holm-Hansen, O.; Riemann, B. (1978). "Chlorophyll *a* determination: improvements in methodology". *Oikos*, 30: 438 – 447. Copenhagen.
- Holm-Hansen, O.; Lorenzen, C. J.; Holmes, R. W.; Strickland, J. D. H. (1965). "Fluorometric determination of chlorophyll". *Journal Cons. Int. Explor.Mer*, 30, 3–15.

- Jeffrey, S.W.; Welschmeyer, N.A. (1997). "Spectrophotometric and fluorometric equations in common use in oceanography. In: *Phytoplankton Pigments in Oceanography*. Monographs on Oceanographic Methodology, 10: 597 – 615.
- Lorenzen, C.J. (1966). "A method for the continuous measurement of in vivo chlorophyll concentration". *Deep-Sea Research*, 13: 223 - 227.
- Wright, S.W.; Jeffrey, S.W.; Mantoura, R.F.C. (1997). "Evaluation of methods and solvents for pigment extraction". In: *Phytoplankton Pigments in Oceanography*. Monographs on Oceanographic Methodology, 10: 261 – 282.

Method 14. Determination of Primary Production

Ramón Varela

Introduction

The primary production rate is defined as the amount of inorganic carbon assimilated by phytoplankton during photosynthesis that is converted into particulate organic matter per unit of time and volume ($\text{mg C m}^{-3} \text{ h}^{-1}$), or surface area ($\text{g C m}^{-2} \text{ d}^{-1}$). This last definition is obtained when integrating a series of production measurements over different depths. The production rate can be measured using radioactive carbon-14 (^{14}C) labeled sodium bicarbonate following the method of Steeman-Nielsen (1952) with changes indicated by Knap *et al.* (1997), IOC (1994), Strickland and Parsons (1972) and Ros (1979). This method allows detection of carbon fixation rates between 0.05 and $100 \text{ mg C m}^{-3} \text{ h}^{-1}$. The procedure that is described fits the conditions of high productivity that are found in coastal waters at the CARIACO station. Specifically, the variables that have been modified are the level of specific activity of the sodium (^{14}C)-bicarbonate solution, the time of incubation at sea and the volume of water that is filtered after the incubation.

Principle of Analysis

Assimilation of dissolved inorganic carbon (DIC) by phytoplankton is estimated when a small amount of ^{14}C is added in the form of $\text{NaH}^{14}\text{CO}_3$ to a water sample and allowing the phytoplankton to incorporate the tracer in the organic matter during photosynthesis. After adding ^{14}C , the samples are incubated “*in situ*” at the depths of origin of each sample for a minimum period of 4 hours. If the total content of CO_2 concentration in the water sample is known as well as the amount of ^{14}C added, the primary production rate can be calculated.

Interferences

1. High levels of light and changes in temperature can alter the results. Phytoplankton from deeper layers are adapted to low levels of light; therefore, when these organisms are exposed to brief periods of intense light, the photosynthesis process may speed up or light or thermal shock may occur. It is important to perform sampling, handling, and filtration of the samples under conditions of dimmed light and at a stable temperature similar to sea temperature.
2. Contamination with trace metals such as Cu, Zn and Fe inhibits carbon fixation. Avoid the contamination by following recommended techniques for cleaning the material, including the Niskin bottles. A suitable cleaning of the instruments and containers used during the analysis assures data quality. In addition, it is important to apply a strict protocol with the material and instruments that make contact with the solution of ^{14}C to avoid contamination from the radioisotope during manipulation as in the work area. Special care with the pipettes is important and avoids transferring the radioisotope between samples. Use trays and absorbent paper for containing spills, and follow safety techniques recommended for this kind of work.

3. CO₂ can be easily lost to the atmosphere from seawater samples; therefore, aliquots taken from the incubation vessels to measure radioactivity are preserved in vials containing 200 μL of 2-phenethylamine (a CO₂ absorber).

Materials

Use only HCl and distilled water to wash the materials that will be in contact with the sample. Do not use detergents or disinfectant cleaners as this may affect the activity of the organisms. Wear polyethylene or vinyl gloves all the time for handling the materials and the preparation of reagents, to avoid contaminating samples and for safety.

1. Glass filtering flasks, capacity 2 L.
2. Polycarbonate funnels for 25 mm diameter filters, capacity 250 mL.
3. Fiber-glass filters Whatman GF/F, diameter 25 mm.
4. Automatic pipettes with capacity of 200 and 1000 μL.
5. Polycarbonate erlenmeyer flasks with screw caps, capacity 300 mL, for incubation (grouped in four for each depth plus a fifth as a blank).
6. Plastic syringes of 60 mL.
7. Glass scintillation vials, capacity 20 mL.
8. Polyethylene or vinyl gloves (powder-free).
9. Tray and absorbent paper, for catching spills in the filtration unit.
10. Buoy, ballast, and line with coastlock snap swivels (or equivalent) to hold flasks on the line.

Reagents

1. **Sodium (¹⁴C) bicarbonate working solution**, (NaH¹⁴CO₃) with an approximate activity of 11 μCi mL⁻¹. Refer to **Appendix 1** for the solution preparation.
2. **Hydrochloric acid** (0.5N HCl).
3. **2-phenethylamine** (C₆H₅CH₂CH₂NH₂), Sigma-Aldrich, Inc., P-2641.
4. **Scintillation liquid (CytoScint[®])**, or similar compatible with aquatic samples.

Equipment

1. Filtration unit and vacuum pump.
2. BetaScout liquid scintillation and luminescence tester, PerkinElmer 2007-0010.

Sampling

Wear polyethylene or vinyl gloves all the time during sampling and sample analysis. See Figure 14.1 for a schematic detail.

Hours before the cruise

1. Wash all the material used in the field with 1% HCl and distilled water. Avoid contact with metallic objects. If the erlenmeyer flasks are new, soak them in 5% HCl for 72 hours. Rinse three times with deionized water. Store the flasks filled with 100 mL of 1% HCl while they are not in use between cruises.
2. Wash the pipette tips with 5% HCl and rinse four times with distilled water. Dry them and store the tips in a polyethylene glove or in a Ziplock[®] bag until they are used.
3. Under a fume hood, add 200 μL of 2-phenethylamine to each scintillation vial that is going to hold water during the analysis. Mark these vials as **S**.
4. Calculate the exact volume of the working bicarbonate to add to each incubation flask, based on its activity, which must be measured previously with the scintillation tester (i in **NOTE 1**).

In the field

1. One or two hours before dawn obtain the samples in order to have enough time to prepare the production array before sunlight is too intense. Collect five water samples from the Niskin bottle directly into polycarbonate flasks for each depth. Rinse three times with the sample; and fill leaving a small air space. Three of the flasks are going to be exposed to light (**L**), the fourth flask corresponds to the “dark bottle” (**D**), and the fifth is used for the measurement of the blanks (**B**) which is only required at some depths. In CARIACO, primary production is measured in eight depths: 1, 7, 15, 25, 35, 55, 75 and 100 m, which includes in this case the totality of the euphotic zone.
2. Keep filled flasks separated by depth in labeled boxes or black bags protected from light while sampling from the rosette.
3. In the laboratory of the boat and under dimmed light conditions, add the working bicarbonate solution ($\sim 11 \mu\text{Ci mL}^{-1}$) to all the flasks **L** and **D**. The volume that is added to each flask must provide an activity between 4 μCi .
4. Withdraw 200 μL of water from one flask marked **L** for each depth and transfer into a vial marked **S** (that contains 2-phenethylamine), label each vial according to the depth of origin (**Sz**). This step is made to determine the radiation levels added to the flasks. Wrap each flask **D** with aluminum foil, as they represent the “dark bottles” which measure dark carbon fixation for each depth.
5. Withdraw 200 μL from each flask without ^{14}C (blanks, **B**) at each depth and transfer to vials marked as **So**. This measures the background natural radiation of seawater and particles.
6. Next, two 30 μL aliquots are taken from the working bicarbonate solution to determine the activity of the solution. Transfer to two vials marked with **S** and differentiate as **Sc**.
7. Withdraw 50 mL of seawater from flask **B** and filter to determine the blank. When finish filtering, rinse the filter with 250 μL of 0.5N HCl. Place the filter unfolded into an empty vial (without 2-phenethylamine) with the side of the filter retaining particles upwards, and mark according to the depth as **Bz**.
8. If production is low ($< 1 \text{ mgC m}^{-3} \text{ h}^{-1}$), increase the volume to filter to 150 mL for all the blanks as well as for all the samples. Record this volume.

Incubation in situ

1. Incubation is done in the water using a production array. Attach a buoy to a line of 120 m length weighted with ballast, and marked with small swivels used to place groups of four flasks (3 **L**'s and 1 **D**) to the depths from which the samples were collected. This method of incubation allows that the samples remain exposed to the same temperature and level of natural light of the depth of origin (IOC, 1994). The buoy must be visible and easy to recover; therefore, it must be equipped with some location mechanism (flag, bright colors, reflecting radar, strobe flash, etc.).
2. Keep the flasks protected from light until deployment. Deploy the productivity array approximately at dawn. Write down time and position of deployment. Incubate the samples for a period of time that captures a representative portion of the luminance energy, which then is extrapolated to the assimilation of a day. This depends on the luminance regime of the site (seasonally variable), as well as of the latitude. At the CARIACO station, the time of incubation is 4 hours at a minimum but no more than 5 hours for logistic reasons. The deployment starts between 6:30 and 7:00 A.M. and it ends between 10:30 and 11:00 A.M. This interval is also equivalent to 1/3 of the hours of light in a day and where 1/3 of the average daily solar energy to the station latitude is received (10.5° N).
3. Once the period of incubation is finished, recover the productivity array. Record the time and position of recovery. Detach each group of flasks from the line and place them in separate labeled dark plastic boxes or bags, protected from light until filtration. Filter as soon as possible to avoid changes due to biological processes within the flask.
4. While keeping the laboratory of the boat under conditions of dimmed light, withdraw 50 mL aliquot from each flask (**L** and **D**) using a 60 mL plastic syringe. Filter into four individual funnels through 25 mm fiberglass filters maintaining vacuum levels of 70 mm Hg or less. Rinse the filter at the end with 250 µL of 0.5N HCl. In periods of low biomass when low levels of productivity are expected, filter 100 mL or 150 mL instead of 50 mL. Place the filter in an empty scintillation vial, cover and refrigerate to 4°C until returning to the laboratory. Identify each vial according to the depth of origin as **Lz** and **Dz**, conducting this operation in sequence from the shallower to the deeper sample.

Sample Analysis

In the laboratory

1. In the shore laboratory, add to all vials (**S**, **B**, **L** and **D**) 10 mL of scintillation liquid, slowly and without producing bubbles, taking care that the surface of the filter is in complete contact with the liquid. Keep the vials protected from light and refrigerate until reading in a scintillation tester. Never freeze.
2. The vials with the liquid are measured in the scintillation tester after four weeks or when the filter looks completely transparent in the liquid. Do not shake the vials, verify that the filter is totally transparent, and the liquid is not turbid. Clean the vials externally with lens paper and make the measurement.

Calculation and Expression of Results

The scintillation testers indicate the average number of light flash emissions (counts per minute, CPM) in vials that contain scintillation liquid. These counts are transformed into disintegrations per minute (DPM), since the equipment and the liquid do not have an efficiency of 100%, and not all the β disintegrations are seen as an individual sparkle. Therefore, it is necessary to determine the efficiency of the equipment before running the samples using a well-known and stable DPM stock solution provided by the manufacturer of the equipment. This efficiency is used to correct the rest of the measurements. Once the values are corrected, production is calculated (in $\text{mg C m}^{-3} \text{ h}^{-1}$) by depth using the following formula:

$$\text{Production} = \frac{[\text{DPM}(\text{Lz}) - \text{DPM}(\text{Dz})] * \left(\frac{V_{\text{ws}}}{V_{\text{wf}}}\right) * \text{DIC} * 1,05 * F_s}{[\text{DPM}(\text{S})] * \left(\frac{V_{\text{ws}}}{V_{\text{al}}}\right) * 12} \quad (1)$$

where

$\text{DPM}(\text{Lz})$ = average DPMs of the three filters in the transparent bottles (**L**) from a single depth corrected with the filter blank (**Bo**).

$\text{DPM}(\text{Dz})$ = DPMs in the filter of the dark bottle (**D**) corrected by the filter blank (**Bo**).

V_{ws} = volume of water in the flask (290 mL, constant in this case).

V_{wf} = volume of filtered water in the flasks **L**, **D** and **B** (50, 100 or 150 mL).

DIC = concentration of inorganic carbon in seawater at sampled depths in mg C m^{-3} .

1,05 = constant describing the difference of diffusivity of the molecules with ^{12}C and ^{14}C in the live cells.

F_s = daily solar energy rate received during the incubation. Relative number calculated based in the area integrated under the solar radiation curve between the period of incubation for the latitude of the station (**NOTE 2**).

$\text{DPM}(\text{S})$ = DPM of the aliquots **Sz**, from the liquid extracted from the flasks **L** at the beginning of the experiment, or added radiation.

V_{al} = volume of the aliquot (or 0.20 mL) extracted from the flask to the vials (**Sz**).

12 = factor for the calculation of the concentration per hour. If the factor is ignored, the calculated production is per day.

References

- Knap, A.H.; Michaels, A. F.; Steinberg, D.; Bahr, F.; Bates, N.; Bell, S.; Countway, P.; Close, A.; Doyle, A.; Dow, R.L.; Howse, F.; Gundersen, K.; Johnson, R.; Kelly, R.; Little, R.; Orcutt, K.; Parsons, R.; Rathbun, C.; Sanderson, M.; Stone, S. (1997). BATS methods manual. Version 4. U.S. JGOFS Planning Office, Woods Hole, 136 pgs.
- Intergovernmental Oceanographic Commission (IOC). (1994). "Protocols for the Joint Global Ocean Flux Study (JGOFS) Core Measurements". Manual and Guides 29, 178 pgs. UNESCO.
- Ros, J. D. (1979) "Prácticas de ecología" Editorial Omega. Barcelona, 181 pgs.
- Steemann, Nielsen E. (1952). "The use of radio-active carbon ^{14}C for measuring organic production in the sea". *Journal due Conseil Permanent International pour l'Exploration de la Mer*, 18(2): 117-140.

Strickland J., D., H.; Parsons T., R. (1972). "A practical handbook of sea water analysis". *Fisheries Research Board of Canada*, Bulletin 167, 2nd edition, Ottawa, 310 pgs.

Appendix 1. Preparation of the working solution of sodium (¹⁴C) bicarbonate (NaH¹⁴CO₃), approximate concentration 11 μCi mL⁻¹

The amount of marked bicarbonate that is added to each flask must have an activity of 4 μCi, which is an adequate level for areas with high productivity (> 1 mgC m⁻² d⁻¹) and short periods of incubation (4 hours). In order to obtain this activity, it is required to prepare an intermediate working solution, between the manufacturer's original activity (1 mCi mL⁻¹) and the final activity that is added to each flask (4 μCi). The radioactive isotope use is restricted under a series of regulations, safety measurements, and protocols for disposal of residues to the environment that varies according to the country. The investigators must know these details and follow their implementation. Perform all the activities related to this analysis on a tray to catch spills and on a table covered with absorbent paper with bottom plastic lining. Wear vinyl gloves all the time.

Materials

Wash all glass material with 10% HCl and distilled water, wrap in aluminum foil, and sterilize in a steam pressure sterilizer for 5 minutes. Remove humidity by placing in an oven to 70 °C for 3 to 4 hours.

1. Glass pipettes 5 mL.
2. Glass beakers, 100 and 500 mL.
3. Volumetric flasks, 100 mL.
4. Glass dropping bottle.
5. Nylon syringe filters, 25 mm diameter and 0.2 μm pore size.
6. Plastic syringes to filter water through the filters, 60 mL.
7. Tuberculin syringes with needle.
8. Serum tubing vials of 15 mL, with stoppers.

Reagents

1. **Concentrated sodium (¹⁴C) bicarbonate solution** (NaH¹⁴CO₃), specific activity 1 mCi mL⁻¹, Amersham CFA3.
2. **Distilled water** coming from a glass still system.
3. **Sodium hydroxide solution** (0.1N NaOH).
4. **Buffer solution** with a pH 10.
5. **Hydrochloric acid** (0.1N HCl).

Equipment

1. pH meter.
2. Magnetic stirrer.
3. Electronic balance, 0.01 g precision.

4. Steam pressure sterilizer.

Preparation of the Solution

1. *Distilled water pH adjustment*
 - a. Add approximately 250 mL of distilled water to a beaker and cover.
 - b. Calibrate the pH meter with a buffer solution of pH 10.
 - c. Adjust the pH of the distilled water to pH 9.5 by adding, drop by drop, a solution of 0.1N NaOH while mixing gently with a magnetic stirrer.
2. *Preparation of the bicarbonate solution (concentration 9 - 11 $\mu\text{Ci mL}^{-1}$)*
 - a. Tare a volumetric flask of 100 mL with its cap.
 - b. Using a plastic syringe of 60 mL with a nylon filter attached, add distilled water with adjusted pH to the flask placed on the balance until 60 mL has been added (determine the volume based on the weight).
 - c. With a tuberculin syringe, extract all the content of the ampoule that contains the concentrated bicarbonate solution and add it to the volumetric flask with the water.
 - d. Rinse the ampoule three or four times with filtered distilled water with adjusted pH, using the tuberculin syringe. Add the water used for rinsing in the volumetric flask that contains the bicarbonate solution.
 - e. Increase the volume in the flask to 90 mL (by weight) with distilled water of adjusted pH using the 60 mL syringe with the filter.
 - f. Mix the content of the flask slightly.
 - g. Decant the working solution to 15 mL serum vials using 5 mL sterile pipettes. Fill six serum vials with 15 mL each. Seal with stoppers. Extract the air from the vial using a tuberculin syringe.
 - h. The specific activity of this working solution is 11 $\mu\text{Ci mL}^{-1}$. Refrigerate at 4 °C by not more than six months.
 - i. The volume of the working solution of bicarbonate added to the incubation flasks to assure an activity of 4 μCi is calculated from the readings with the scintillation tester. This volume must be of $420 \pm 45 \mu\text{L}$. Before closing the last vial, extract 30 μL and add them to a scintillation vial of 200 μL that contains 2-phenethylamine. Measure in the scintillation tester the real activity of the solution and determine accurately the volume of solution necessary to obtain an activity 4 μCi by dose.

$$\text{Activity in } \mu\text{Ci mL}^{-1} = (\text{DPM}(\text{Sc})/2200000)/0.03 \text{ mL} \quad (2)$$

The indicated volume assumes that each prepared vial will be used on a single cruise with a minimum residue. Thus, 15 mL will allow you to prepare 32 incubation flasks. The solution in the vials loses activity with time if they are not full due to CO_2 loss.

Appendix 2. F_s calculation

For primary production calculations, a factor F can be used that takes into account not only the time for incubation, but also the solar proportion of the daily energy, which the samples receive. Because it is not possible to do the incubation in CARIACO for an entire daylight period (12 hours), the amount of energy is not the same at the time incubation begins and that at the end. Using a sensor of luminance radiation (with cosine collector), the curve of daily solar radiation coming from the sky can be determined (Figure 14.2). These curves also can be calculated from tables based on the latitude and the month of the year. Solar factor F_s is the proportion of the area under the curve in the interval of the hours used for the incubation in relation to the total area under the curve. The object is to ensure the proportion is at least a third of the daily energy and that the number of hours is also a third of the period of light.

The previous statement can be ignored if the luminous energy is not taken into account but instead the hours of incubation are used, for which it is only necessary to eliminate the F_s factor in the numerator of formula (1), and replace constant 12 in the denominator by the time in hours of incubation in decimal fraction.

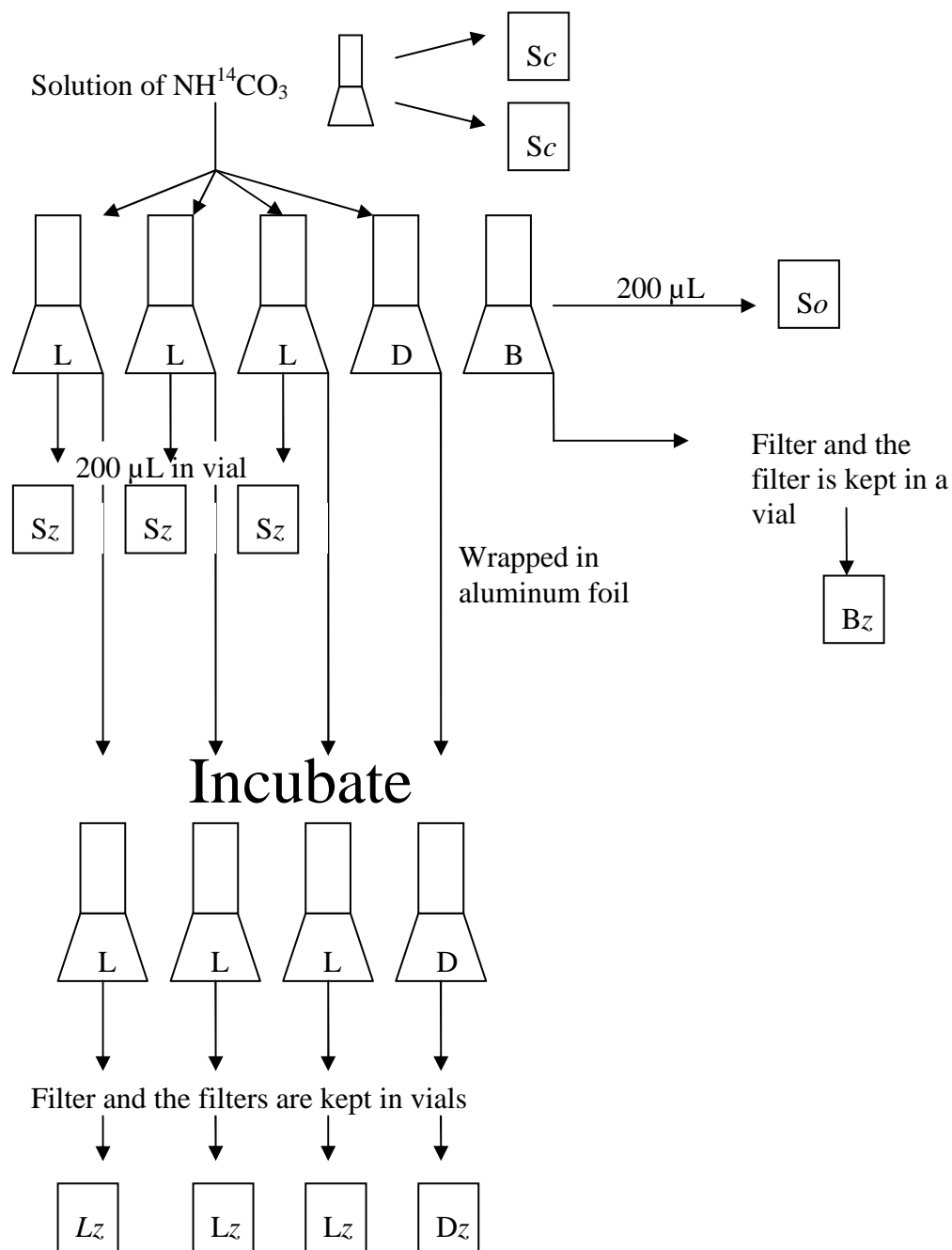


Figure 14.1. Diagram of the procedure to follow during primary production analysis. The vials marked with S are filled with 200 μL of 2-phenethylamine.

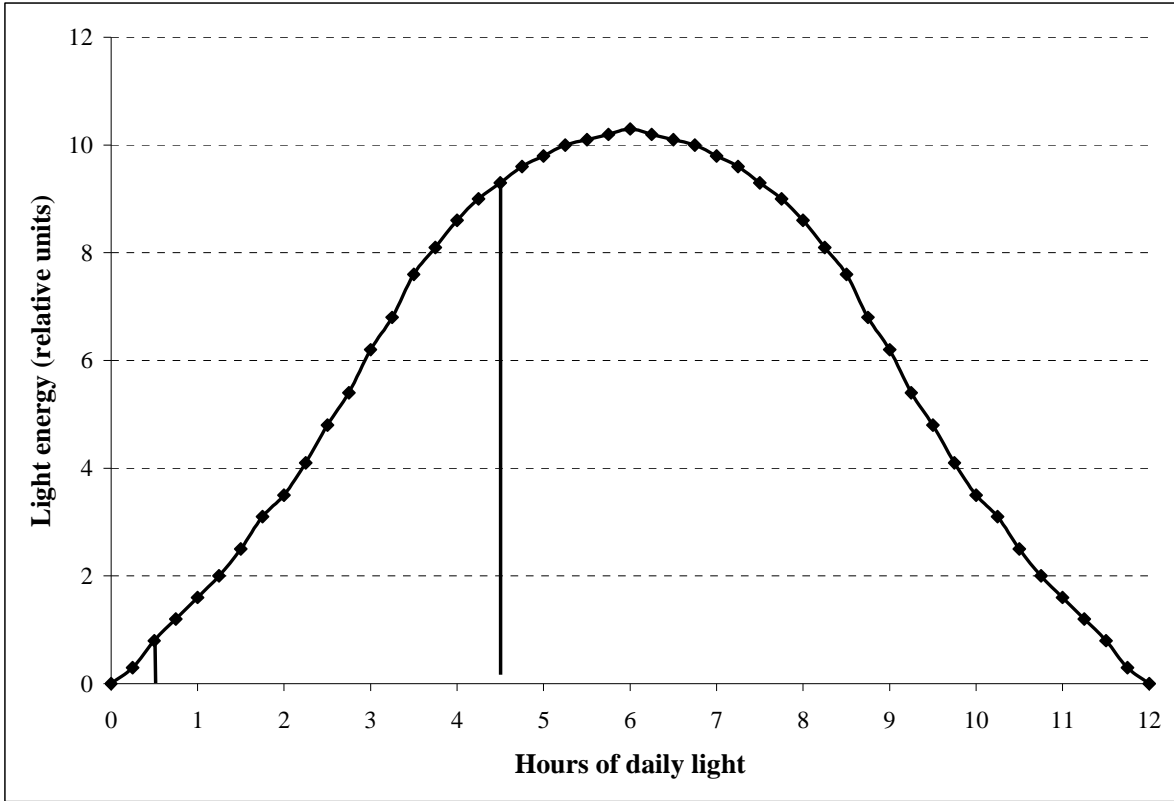


Figure 14.2. Curve of daily solar radiation at the CARIACO station. The vertical line indicates the period of incubation used in CARIACO.