

01

ESTRAMAR 



PROGRAMA
MAC 2007 - 2013
Cooperación Transnacional



PTL-ALC
PTL-SAL
PTL-02
PTL-ChL
PTL-CTD

manual de
procedimientos técnicos
y buenas prácticas

01



manual de
procedimientos técnicos
y buenas prácticas

CRÉDITOS

EDITORES:

Plataforma Oceánica de Canarias (PLOCAN)

AUTORES:

Patricia López y M^a José Rueda

Copyright © 2012 Plataforma Oceánica de Canarias (PLOCAN).

Depósito Legal: GC 1071-2012

ISBN: 84-695-6496-X

978-84-695-6496-7

AGRADECIMIENTOS:

Este trabajo ha sido financiado por fondos FEDER de la Unión Europea como parte del proyecto ESTRAMAR perteneciente a la Segunda Convocatoria del Programa de Cooperación Transnacional MAC 2007-2013.

ESTRAMAR 



PROGRAMA
MAC 2007 - 2013
Cooperación Transnacional

Unión Europea
FEDER
Invertimos en su futuro



ÍNDICE

9

A PTL-ALC: DETERMINACIÓN DE LA ALCALINIDAD TOTAL (Medición utilizando un valorador automático)

Procedimiento de recogida y tratamiento de las muestras	10
Material necesario	10
Reactivos y estándares	10
Limpieza del material	11
Toma de muestras, conservación y almacenamiento	11
Valoración de la muestra y cálculo de los resultados	11
Mediciones utilizando el valorador Titrino	12
Utilización del Titrino y teclado	12
Referencias	13
Anexo	13
Cambios unidades en Alcalinidad total	13

15

B PTL-SAL: DETERMINACIÓN DE LA SALINIDAD (Medición utilizando el AUTOSAL)

Procedimiento de recogida y tratamiento de las muestras	16
Material necesario	16
Reactivos y estándares	16
Limpieza del material	16
Toma de muestras, conservación y almacenamiento	16
Mediciones utilizando el AUTOSAL.	17
Referencias	18

19

C PTL-SAL: DETERMINACIÓN DE LA SALINIDAD (Medición utilizando el PORTASAL)

Procedimiento de recogida y tratamiento de las muestras	20
Material necesario	20
Reactivos y estándares	20
Limpieza del material	20
Toma de muestras, conservación y almacenamiento	20
Mediciones utilizando el PORTASAL.	21
Referencias	22

D**PTL-02:**

DETERMINACIÓN DEL OXÍGENO DISUELTO. MÉTODO YODOMÉTRICO.

(Medición utilizando un valorador automático)

23

Procedimiento de recogida y tratamiento de las muestras	24
Material necesario	24
Reactivos y estándares	24
Limpieza del material	25
Toma de muestras, conservación y almacenamiento	25
Determinación del blanco	26
Valoración de la muestra y cálculo de los resultados	26
Mediciones utilizando el valorador Titrino	27
Utilización del Titrino y teclado	27
Referencias	28
Anexos	28
Anexo I: Determinación del volumen de las botellas para la toma de muestras	28
Anexo II: Desgasificación del agua utilizando el baño ultrasónico	29
Anexo III: Preparación de mezcla crómica	29

E**PTL-ChL:**DETERMINACIÓN DE CLOROFILA *a* POR FLUORIMETRÍA.

(Anexo para la determinación por espectrofotometría)

31

Procedimiento de recogida y tratamiento de las muestras	32
Material necesario	32
Reactivos y estándares	32
Limpieza del material	32
Toma de muestras, conservación y almacenamiento	32
Control de calidad	33
Procedimiento de extracción	33
Cálculo de las concentraciones	33
Mediciones utilizando el FLUORÓMETRO 10-AU.	34
Material necesario	34
Ajuste del equipo	34
Hacer el blanco del instrumento	36
Calibrar con el estándar	36
Mediciones de las muestras	36
Referencias	37
Anexos	37
Anexo I: Método espectrofotométrico para la determinación de clorofila <i>a</i>	37
Material necesario	37
Reactivos y estándares	37
Procedimientos de extracción y medida	37
Cálculo de concentraciones	38
Referencias	38

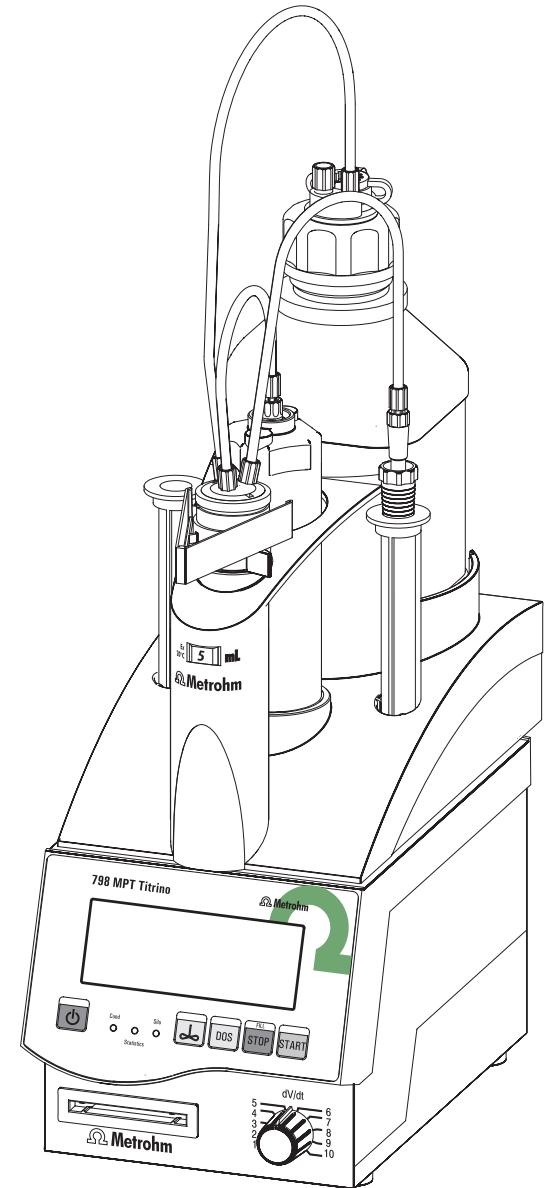
F**PTL-CTD:
CALIBRACIÓN Y MANTENIMIENTO DEL CTD IDRONAUT SEVEN 316PLUS.**

Datos generales	40
Calibraciones	41
Sensor de presión	41
Sensor de temperatura y conductividad	42
Simple comprobación de la calibración del sensor de conductividad	42
Sensor de oxígeno	42
Sensor de pH y de referencia	43
Mantenimiento de los sensores	44
Sensor de conductividad	44
Sensor de oxígeno	44
Sensor de pH y sensor de referencia	44

PTL-ALC:

DETERMINACIÓN DE LA ALCALINIDAD TOTAL

(Medición utilizando un valorador automático)

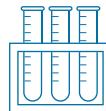


1

PROCEDIMIENTO DE RECOGIDA Y TRATAMIENTO DE LAS MUESTRAS

Para la determinación de alcalinidad en muestras acuosas se siguen las recomendaciones de la EPA: Método 310.1 y los protocolos del Joint Global Ocean Flux Study (JGOFS). En este manual se describe un procedimiento para la determinación de Alcalinidad Total (TA) en muestras de agua mar en un sistema abierto.

La alcalinidad de un agua se debe principalmente a la presencia de iones bicarbonatos, carbonatos a hidróxidos, y constituye la capacidad para neutralizar ácidos. Se calcula mediante una valoración con ácido clorhídrico o ácido sulfúrico a el punto de equivalencia del bicarbonato y el ácido carbónico (pH 4.3-4.5 aproximadamente).



MATERIAL NECESARIO

- Pipetas de precisión de 10 mL con puntas desechables.
- Pipetas de 50 mL de borosilicato y aspirador de pipetas.
- Botellas de vidrio con tapa cónica biselada y de volumen conocido. Puede darse el caso que no se conozca el volumen exacto, pero esto no nos importa porque valoramos un volumen conocido.
- Erlenmeyer de 125mL o mayor
- Vasos de precipitado de 100 y 500mL
- Probetas de 100 mL.
- Mangueras silicona flexibles para la captación de muestra de la botella Niskin, con diámetro no mayor de 4 mm.
- Valorador Titrino (Metrohm) de émbolo con una resolución mínima de 0,01mL.
- Agitador magnético.
- Balanza analítica, con precisión de 0,1mg.



REACTIVOS Y ESTÁNDARES

Los reactivos necesarios serán de calidad analítica y el agua a utilizar será destilada o bidestilada y serán los siguientes:

- **Carbonato sódico 0,1 M:** antes de preparar los reactivos debemos dejar en una estufa el reactivo a 120 °C durante al menos 24 horas, luego con cuidado lo dejamos en un desecador. Para preparar el patrón, pesaremos 2,50 g lo más preciso posible y diluimos hasta 1 L de volumen final en un matraz aforado.
- **Solución saturada de cloruro de mercurio (II):** se prepara añadiendo 22 g en 350 mL de agua. Esta solución debe ser manejada con mucho cuidado ya que es veneno, siempre se debe trabajar con guantes.
- **Solución de ácido clorhídrico (0,1 M):** Diluir 8,3 mL de HCl al 37 % calidad PA en 1 L de agua destilada o bidestilada. Como no se conoce a ciencia cierta la concentración resultante, se deberá valorar con la solución patrón de carbonato de

magnesio, de la cual si conocemos su concentración. Para ello seguiremos los siguientes pasos:

Valoración del HCl 0,1 M

En un vaso de precipitado de 100 mL de volumen se colocan 10mL del patrón de carbonato cálcico y se añaden 90mL de agua bidestilada medidos con una probeta. Se valoran y la concentración del HCl (c, expresada en mol/L) se calcula según la ecuación:

$$c = \frac{A \times B}{53 \times C}$$

Donde:

A: peso de Na_2CO_3 (g) que se pesó para 1 L de solución patrón.

B: mL de la solución de Na_2CO_3 que se valora (hemos dicho que será 10 mL)

C: mL de HCl utilizados hasta alcanzar el punto de inflexión que corresponde con el punto final de la valoración (pH 4.5)

La solución de HCl se valorará diariamente.



LIMPIEZA DEL MATERIAL

El material se limpiará con agua destilada o bidestilada. Cada cierto tiempo y al principio, deberemos dejar un par de días las botellas en HCl al 10%.



TOMA DE MUESTRAS, CONSERVACIÓN Y ALMACENAMIENTO

Para el muestreo es recomendable hacerlo entre dos personas, una para el muestreo y otra para fijar las muestras en el mismo momento que se toman.

Las muestras para alcalinidad se toman de las botellas Niskin después de recolectar las de gases como DMS, CO₂ y O₂. Las muestras se pueden tomar por duplicado.

Para la obtención de la muestra se utiliza una manguera de silicona conectada a la espita de la botella Niskin. Esto reduce la introducción de burbujas de aire mientras se captta la muestra. Elevar el extremo final de la manguera, abrir el paso de agua y remover las burbujas de aire presionando la

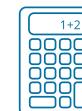
manguera con los dedos. Colocar el matraz de forma invertida e introducir el tubo hasta el fondo del mismo. Enjuagar el matraz y su tapa con la muestra dos veces. Poner la botella en posición vertical y permitir que el agua desborde.

Para calcular cuánta agua debe rebosar, estimar primero cuánto 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 (hay que tener en cuenta la disponibilidad de agua que tengamos, hay veces que está muy restringida). Para retirar la manguera, cerramos el flujo y retiramos la manguera de la botella con cuidado.

Se añade la solución saturada de cloruro de mercurio (II) de tal manera que obtengamos una dilución del 0,02 %, esto equivale a unos 50 µL a muestras de volúmenes menores de 250 mL.

Colocar cuidadosamente la tapa correspondiente al matraz, sin que queden burbujas dentro del mismo. Para ello se inclina la botella y se deja caer la tapa en el sentido contrario al biselado.

Guardar el matraz a temperatura ambiente protegido de la luz en las cajas de plástico cerrada. Analizar las muestras lo antes posible, intentar al día siguiente.



VALORACIÓN DE LA MUESTRA Y CÁLCULO DE LOS RESULTADOS

Se agita bien la botella antes de abrirla y se cogen 50 mL con la pipeta de borosilicato. Se colocan en un vaso de precipitado y valoramos.

La alcalinidad total (TA), expresada en mg/L de CaCO₃, se obtiene por la fórmula:

$$TA = \frac{A \times N \times 50000}{vol}$$

Donde:

A: mL de ácido utilizado para alcanzar el punto de inflexión (pH 4,5)

N: Normalidad de HCl

vol: mL de muestra valorada (50 mL)

El resultado se expresa con un decimal.

2

MEDICIONES UTILIZANDO EL VALORADOR TITRINO

Para las mediciones de las muestras se puede controlar el valorador desde el ordenador o desde el propio equipo. A continuación se detalla el controlador desde el Titrino.

UTILIZACIÓN DEL TITRINO Y TECLADO

En este caso se controla la valoración desde el propio valorador y utilizando el teclado. El método ya está guardado en el equipo y solo deberemos introducir las variables necesarias (como concentración de patrón, volúmenes, etc.). En caso que no esté cargado el método se debe consultar el manual del equipo.

Debemos siempre comprobar que al introducir la muestra esté el agitador magnético dentro y que el agitador del sistema esté encendido. El electrodo y el dispensador de ácido deben quedar sumergidos.

Antes de comenzar debemos vaciar y llenar manualmente al menos 2 veces la bureta, para ello en el Titrino directamente en la tecla 'DOS' y cuando se ha vaciado en 'FILL'.

1. Primero procedemos a valorar el HCl utilizando el patrón preparado, para ello seguimos los siguientes pasos:

User method

Cargar method- Enter

Con la tecla '→' seleccionamos el método, en este caso 'HClM'.

Vamos a **SMPL Data** e introducimos el valor de la cantidad de Na_2CO_3 que se utilizó para preparar el patrón en 1 L. En el teclado seleccionamos '**CONFIG**' **Variables comunes** (comprobar que los valores son los adecuados):

C32: debe tener el valor de 10, ya que es el volumen en mL de patrón valorado. En caso que utilicemos otro volumen, deberemos cambiarlo aquí antes de correr el programa.

C33: debe tener el valor de 53

Corremos el método apretando la tecla 'Start' y guardamos el volumen de ácido que se ha utilizado (EP2) y el valor que calcula de la concentración de HCl (mol/L).

Debemos asegurarnos en la pantalla que el EP2 (punto de inflexión de pH 4.5) es el que estamos buscando, ya que algunas veces puede ocurrir que la curva muestre algún otro punto, o que no sea sensible el método para detectar el EP1 y se realicen los cálculos con un punto erróneo. En este caso deberemos tomar el valor real del EP2 y calcularlo nosotros. Se repetirán las medidas 3 veces y la media será el valor que introduciremos en la siguiente sección para la concentración de HCl.

2. A continuación procederemos a valorar las muestras, para ello seguimos los siguientes pasos:

User method

Cargar method- Enter

Con la tecla '→' seleccionamos el método, en este caso 'ALK'.

Vamos a **SMPL Data** e introducimos el volumen en mL de muestra que vamos a analizar.

En este menú podremos introducir

datos de la muestra como por ejemplo: **C21** es el número de estación, **C22** número de botella Niskin y **C23** el número de la botella de muestra (que no son los que vamos a utilizar en el laboratorio normalmente), en este menú introduciremos en peso el volumen de la botella que tiene marcado, y en unidad de peso seleccionamos mL. En el teclado seleccionamos '**CONFIG**' **Variables comunes**

C30: introducimos la normalidad del HCl que calculamos anteriormente, con dos cifras decimales.

C31: toma el valor fijo de 50000.

Una vez seleccionados le damos a **Quit** para entrar en la pantalla donde veremos los datos de mediciones anteriores, al dar a 'Start' comenzará la valoración. Si al finalizar la valoración aparece el mensaje 'error 42' puede ser que no esté conectada la impresora, pero podremos saltarlo volviendo a presionar '**Quit**'.

De los datos que aparecen apuntamos el valor de volumen de ácido gastado en el punto de inflexión pH 4.5 (que debe ser nuevamente EP2) y el valor de TA en mg/L de CaCO_3 .

Sacamos la muestra, limpiamos el electrodo y colocamos la siguiente muestra con el agitador magnético.

3

REFERENCIAS

4

ANEXOS

- *EPA Method 310.1: Alkalinity by Titration.* Official Name: Alkalinity (Titrimetric, pH 4.5)
- **Knap, A., A. Michaels, A. Close, H. Ducklow and A. Dickson (eds.)**
1996. *Protocols for the Joint Global Ocean Flux Study (JGOFS) Core Measurements.* JGOFS Report Nº 19.

CAMBIOS UNIDADES EN ALCALINIDAD TOTAL:

Se determina mediante valoración siguiendo procedimiento establecido por método 310.1 de la EPA. Con este método la Alcalinidad Total (TA) se da en mg/L de CaCO₃.

Otro método es obtener los valores de TA en µmol/kg de ácido necesario para llevar la muestra a pH de 4.5, en este caso para transformar los valores a mg/L:

$$\mu\text{mol/kg} * \rho_{sw} * P_m / 1000 / 2 = \text{mg/L}$$

Donde:

ρ_{sw}: densidad de agua de mar
(ver tabla valores ejemplos)

P_m: peso molecular del CaCO₃
(100 g/mol)

Densidad con	Salinidad 33%	Salinidad 34,5%	Salinidad 36%
16°C	1,025g/cm ³	1,026g/cm ³	1,0265g/cm ³
20°C	1,0235g/cm ³	1,025g/cm ³	1,0255g/cm ³
25°C	1,022g/cm ³	1,023g/cm ³	1,024g/cm ³
28°C	1,0215g/cm ³	1,0225g/cm ³	1,023g/cm ³
30°C	1,020g/cm ³	1,0215g/cm ³	1,0225g/cm ³

El dividir por 1000 es el cambio de unidad y dividir por 2 es debido a que:

$$\text{Alcalinidad Total} = 2[\text{CO}_3^{2-}] + [\text{HCO}_3^-] + [\text{OH}^-] - [\text{H}^+]$$

Por tanto los valores medios de Alcalinidad de agua de mar se encuentra en el rango de 100-125 mg/L CaCO₃ (2000-2500 µmol/kg aproximadamente).

PTL-SAL:

DETERMINACIÓN DE LA SALINIDAD

(Medición utilizando el AUTOSAL)

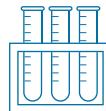
3



1

PROCEDIMIENTO DE RECOGIDA Y TRATAMIENTO DE LAS MUESTRAS

Para la determinación de salinidad se siguen las recomendaciones del fabricante Guildeline y los protocolos del Joint Global Ocean Flux Study (JGOFS). En este manual se describe un procedimiento para la determinación de salinidad en muestras de agua mar.



MATERIAL NECESARIO

- Botellas oscuras de tapón con goma que permite sellarla.
- Equipo AUTOSAL Guildeline.



REACTIVOS Y ESTÁNDARES

Para la calibración del equipo se utiliza agua de mar estándar IAPSO. Éste es el único estándar preciso reconocido. Son ampollas cerradas que tienen en las etiquetas los datos la fecha de llenado junto a los valores de K15 y de salinidad.



TOMA DE MUESTRAS, CONSERVACIÓN Y ALMACENAMIENTO

Las muestras para salinidad se toman de las botellas Niskin después de recolectar las de gases, metales y nutrientes. Las muestras se toman por duplicado.

Para la obtención de la muestra se utiliza una manguera de silicona conectada a la espita de la botella Niskin. Se añade un poco y se agita bien tres veces, y luego ya se rellena bien la botella que rebose y se cierra, sin dejar burbujas.

Guardar la botella a temperatura ambiente protegido de la luz en las cajas de plástico cerrada. Analizar las muestras lo antes posible.



LIMPIEZA DEL MATERIAL

El material se limpiará antes de su uso utilizando lavavajillas sin detergentes.



MEDICIONES UTILIZANDO EL AUTOSAL

Para las mediciones de las muestras se utiliza el equipo AUTOSAL Salinometer 8400-A.

Antes de analizar las muestras debemos encender el equipo mínimo 24 horas antes para que se estabilice la temperatura

Luego seguiremos los siguientes pasos (siempre el botón 'FUNCTION' debe estar en 'SBY' antes de empezar cada operación):

1. HACER CERO

Para hacer el 'ZERO' utilizamos agua Milli-Q y una botella limpia de las mismas que se utilizan para las muestras. La colocamos con cuidado en el equipo de tal manera que haga vacío. Antes de colocarla debemos limpiar bien el tubo y tapón del equipo con agua bidestilada y secarlo con papel de laboratorio.

Encendemos 'PUMPS ON' y que el flujo 'FLOW RATE' esté al máximo.

Cuando esté lleno colocamos el dedo en 'FLUSH' para vaciar la célula y dejamos que se llene nuevamente. Repetimos esta operación 3 veces.

Después de realizar estas operaciones y la célula esté bien llena y sin burbujas, se apaga la bomba. Colocamos el botón 'FUNCTION' en 'ZERO'. Nos fijamos en la pantalla que el valor de las cuatro últimas cifras no debe ser mayor de ± 0005 . Si en la pantalla los números están parpadeando, deberemos ir moviendo el botón 'SUPPRESSION' hasta que la medida entre en escala (veremos que deja de parpadear la pantalla).

2. ESTANDARIZACIÓN

- Medidas de estándares IAPSO:

Agitamos la botella del estándar y la colocamos con cuidado en el equipo de tal manera que haga vacío. Antes de colocarla debemos limpiar bien el tubo y tapón del equipo con agua bidestilada y secarlo con papel de laboratorio. Encendemos 'PUMPS ON' y que el flujo 'FLOW RATE' esté al máximo.

Cuando esté lleno colocamos el dedo en 'FLUSH' para vaciar la célula y dejamos que se llene nuevamente. Repetimos esta operación 3 veces.

Después de realizar estas operaciones y la célula esté bien llena y sin burbujas, apagamos la bomba.

El botón de 'FUNCTION' lo colocamos en la posición 'READ' y cuando se haya estabilizado la medida, tomamos el valor que nos da el equipo. Si en la pantalla los números están parpadeando, deberemos ir moviendo el botón 'SUPPRESSION' hasta que la medida entre en escala (veremos que deja de parpadear la pantalla). Luego el botón 'FUNCTION' vuelve a la posición 'SBY'.

Repetimos el proceso de llenado y vaciado de la célula y de lectura otras dos veces (o más en caso

que los valores no sean los dados por el estándar). No hace falta vaciar la célula 3 veces para volver a medir, ya que con la primera vez habremos limpiado y homogenizado la célula.

Apagamos la bomba 'PUMP OFF'.

En caso que los valores no sean los esperados para el estándar, se debe proceder a la estandarización.

Para eso cuando la célula esté llena con la muestra y tengamos ajustado el caudal (como se ha indicado antes), el botón 'STANDARDIZATION' lo vamos moviendo hasta el valor se ajuste al esperado. En caso que no sea estable la medida, deberemos desechar el vial del estándar IAPSO y realizar las medidas con otro nuevo.

- Medidas de agua subestándar:

Son muestras de 3000 m aproximadamente de profundidad que han sido cogidas en campañas en la estación ESTOC. Se miden para comprobar la estabilidad del salinómetro y detectar posibles derivas o mal funcionamiento.

Para medir se siguen los mismos pasos que para estándares IAPSO. Los resultados se comparan con valores obtenidos en otros muestreos y los valores deben estar en el error de salinidad de $\pm 0,005$.

3. MEDIDAS DE LAS MUESTRAS

Para minimizar los errores, las muestras son medidas de en cada estación desde la superficie hasta el fondo, y desde el fondo a la superficie en la siguiente estación.

Antes de colocar la botella en el equipo, debemos primeramente agitar bien y luego limpiar con cuidado y con papel de laboratorio humedecido la boca de las mismas, ya que pueden haber precipitado sales.

El procedimiento será el mismo que cuando medimos estándares. Se llenará la célula de 4-5 veces antes de medir y los resultados no deben variar más de 5 dígitos en la segunda cifra decimal en las tres mediciones que se realizan.

4. MEDIDAS DE LAS MUESTRAS

Al terminar de medir las muestras, se debe realizar al menos una medición de agua subestándar. Luego colocamos agua bidéstilada en el equipo y llenado y vaciamos la célula unas 8-10 veces.

La última vez, cuando esté llena la célula, apagamos la bomba (**PUMPS OFF**).

3 REFERENCIAS

- *Manual Guideline AUTOSAL Salinometer 8400A.*
- **Knap, A., A. Michaels, A. Close, H. Ducklow and A. Dickson (eds.)**
1996. *Protocols for the Joint Global Ocean Flux Study (JGOFS) Core Measurements.* JGOFS Report N° 19.

PTL-SAL:

DETERMINACIÓN DE LA SALINIDAD

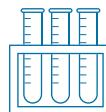
(Medición utilizando el PORTASAL)



1

PROCEDIMIENTO DE RECOGIDA Y TRATAMIENTO DE LAS MUESTRAS

Para la determinación de salinidad se siguen las recomendaciones del fabricante Guildeline y los protocolos del Joint Global Ocean Flux Study (JGOFS). En este manual se describe un procedimiento para la determinación de salinidad en muestras de agua mar.



MATERIAL NECESARIO

- Botellas oscuras de tapón con goma que permite sellarla.
- Equipo PORTASAL Guildeline.



REACTIVOS Y ESTÁNDARES

Para la calibración del equipo se utiliza agua de mar estándar IAPSO. Éste es el único estándar preciso reconocido. Son ampollas cerradas que tienen en las etiquetas los datos la fecha de llenado junto a los valores de K15 y de salinidad.



TOMA DE MUESTRAS, CONSERVACIÓN Y ALMACENAMIENTO

Las muestras para salinidad se toman de las botellas Niskin después de recolectar las de gases, metales y nutrientes. Las muestras se toman por duplicado.

Para la obtención de la muestra se utiliza una manguera de silicona conectada a la espita de la botella Niskin. Se añade un poco y se agita bien tres veces, y luego ya se rellena bien la botella que rebose y se cierra, sin dejar burbujas.

Guardar la botella a temperatura ambiente protegido de la luz en las cajas de plástico cerrada. Analizar las muestras lo antes posible.



LIMPIEZA DEL MATERIAL

El material se limpiará antes de su uso utilizando lavavajillas sin detergentes.



MEDICIONES UTILIZANDO EL PORTASAL

Para las mediciones de las muestras se utiliza el equipo Portasal.

Antes de analizar las muestras debemos encender el equipo mínimo 24 horas antes para que se estabilice la temperatura

Luego seguiremos los siguientes pasos (siempre el botón 'FUNCTION' debe estar en 'SBY' antes de empezar cada operación):

1. HACER CERO

Para hacer el 'ZERO' utilizamos agua Milli-Q y una botella limpia de las mismas que se utilizan para las muestras. La colocamos con cuidado en el equipo de tal manera que haga vacío. Antes de colocarla debemos limpiar bien el tubo y tapón del equipo con agua bidestilada y secarlo con papel de laboratorio. Encendemos 'PUMPS ON' y que el flujo 'FLOW RATE' esté al máximo.

Cuando esté lleno colocamos el dedo en 'FLUSH' para vaciar la célula y dejamos que se llene nuevamente. Repetimos esta operación 3 veces.

Después de realizar estas operaciones y la célula esté bien llena y sin burbujas, colocamos el 'FLOW RATE' a $\frac{1}{4}$ de flujo máximo aproximadamente. Colocamos el botón 'FUNCTION' en 'ZERO' y presionamos el botón 'COND'. Cuando la conductividad medida es estable presionamos 'ZERO'. El display deberá poner 'ZERO x.xxxxx'. El valor del ZERO no debe ser mayor de ± 0.00075 . Cuando este valor no esté oscilando, presionamos el botón 'COND' y en el display deberemos leer 'RATIO 0.00000'.

2. ESTANDARIZACIÓN

- **Medidas de estándares IAPSO:** Agitamos la botella del estándar y la colocamos con cuidado en el equipo de tal manera que haga vacío. Antes de colocarla debemos limpiar bien el tubo y tapón del equipo con agua bidestilada y secarlo con papel de laboratorio. Encendemos 'PUMPS ON' y que el flujo 'FLOW RATE' esté al máximo.

Cuando esté lleno colocamos el dedo en 'FLUSH' para vaciar la célula y dejamos que se llene nuevamente. Repetimos esta operación 3 veces.

Después de realizar estas operaciones y la célula esté bien llena y sin burbujas, colocamos el 'FLOW RATE' a $\frac{1}{4}$ de flujo máximo aproximadamente. El botón de 'FUNCTION' lo colocamos en la posición 'READ' y cuando se haya estabilizado la medida, tomamos el valor que nos da el equipo. Luego el botón 'FUNCTION' vuelve a la posición 'SBY'.

Repetimos el proceso de llenado y vaciado de la célula y de lectura otras dos veces (o más en caso que los valores no sean los dados por el estándar). No hace falta vaciar la célula 3 veces para

volver a medir, ya que con la primera vez habremos limpiado y homogenizado la célula.

Apagamos la bomba 'PUMP OFF'. En caso que los valores no sean los esperados para el estándar, se debe proceder a la estandarización. Para eso en el botón 'STD' y aparecerá en la pantalla el mensaje 'STD STANDARDIZE' y presionamos 'ENTER'. Una vez ahí tendremos que entrar el dato de la conductividad que aparece en la botella del estándar y el número de Batch de la misma y le damos 'ENTER' de nuevo. Vaciamos y llenamos la célula hasta que obtengamos el valor de conductividad esperado, entonces presionamos 'COND'.

En caso que no sea estable la medida, deberemos desechar el vial del estándar IAPSO y realizar las medidas con otro nuevo.

- **Medidas de agua subestándar:** Son muestras de 3000m aproximadamente de profundidad que han sido cogidas en campañas en la estación ESTOC. Se miden para comprobar la estabilidad del salinómetro y detectar posibles derivas o mal funcionamiento.

Para medir se siguen los mismos pasos que para estándares IAPSO. Los resultados se comparan con valores obtenidos en otros muestreos y los valores deben estar en el error de salinidad de $\pm 0,005$.

3. MEDIDAS DE LAS MUESTRAS

Para minimizar los errores, las muestras son medidas de en cada estación desde la superficie hasta el fondo, y desde el fondo a la superficie en la siguiente estación.

Antes de colocar la botella en el equipo, debemos primeramente agitar bien y luego limpiar con cuidado y con papel de laboratorio humedecido la boca de las mismas, ya que pueden haber precipitado sales.

El procedimiento será el mismo que cuando medimos estándares. Se llenará la célula de 4-5 veces antes de medir y los resultados no deben variar más de 5 dígitos en la segunda cifra decimal en las tres mediciones que se realizan.

4. MEDIDAS DE LAS MUESTRAS

Al terminar de medir las muestras, se debe realizar al menos una medición de agua subestándar. Luego colocamos agua bidestilada en el equipo y llenado y vaciamos la célula unas 8-10 veces.

La última vez, cuando esté llena la célula, reducimos el 'FLOW RATE' y apagamos la bomba (PUMPS OFF).

3 REFERENCIAS

- *Manual Guideline AUTOSAL Salinometer 8400A.*
- **Knap, A., A. Michaels, A. Close, H. Ducklow and A. Dickson (eds.)**
1996. *Protocols for the Joint Global Ocean Flux Study (JGOFS) Core Measurements.* JGOFS Report N° 19.

PTL-02:
DETERMINACIÓN
DEL OXÍGENO DISUELTO.
MÉTODO YODOMÉTRICO.
(Medición utilizando un valorador automático)



1

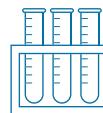
PROCEDIMIENTO DE RECOGIDA Y TRATAMIENTO DE LAS MUESTRAS

Para la determinación de oxígeno disuelto en muestras d agua de mar se siguen las recomendaciones de la normativa UNE EN 25813:1992 y los protocolos del Joint Global Ocean Flux Study (JGOFS). En este manual se describe un procedimiento para la determinación de oxígeno disuelto en agua que se conoce como 'Método Winkler' y que tiene como límite de detección 0,2 mg/L de oxígeno disuelto.

Para el caso de presencia de sustancias orgánicas, sulfuros, etc., es recomendable utilizar el método electroquímico (aunque no es el procedimiento

habitual en las muestras en este laboratorio). En presencia de sustancias oxidantes o reductoras es necesario modificar el método (consultar la normativa en el capítulo 9).

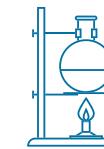
El método descrito se basa en la reacción el oxígeno disuelto en la muestra con hidróxido de manganoso (II) recientemente precipitado, formado por la adición de hidróxido de sodio o potasio al sulfato manganoso (II). Se acidifica, oxidándose el yoduro y liberándose una cantidad equivalente de yodo. Se determina la cantidad de yodo liberado por valoración con tiosulfato sódico.



MATERIAL NECESARIO

- Pipetas de precisión de 1 y 10 mL con puntas desechables. Las pipetas están identificadas para cada reactivo, es MUY IMPORTANTE que no se mezclen, además si viéramos que hay formación de precipitado en las puntas, deberemos cambiarlas (para evitar esto debemos evitar que las puntas toquen la muestra).
- Botellas de vidrio con tapa cónica biselada y de volumen conocido. Puede darse el caso que no se conozca el volumen exacto y que se deba calcular el mismo (ver anexo I para ello), aunque para muestras reales no se deben elegir botellas que no estén taradas.
- Erlenmeyer de 125mL o mayor.
- Vasos de precipitado de 100 y 500mL
- Probeta de 100mL.
- Mangueras silicona flexibles para la captación de muestra de la botella Niskin, con diámetro no mayor de 4 mm.
- Balanza analítica, con precisión de 0,1mg.

- Valorador Titrino (Metrohm) de émbolo con una resolución mínima de 0,01mL.
- Agitador magnético.
- Balanza granataria de hasta 2Kg máximo y con precisión de 0,01g



REACTIVOS Y ESTÁNDARES

Los reactivos necesarios serán de calidad analítica y el agua a utilizar será destilada o bidestilada y serán los siguientes:

- **Solución de ácido sulfúrico:** se añaden 500mL de ácido sulfúrico concentrado a 500mL de agua, agitando continuamente. Hay que tener mucho cuidado ya que el recipiente se calienta mucho, además hay que añadir el ácido muy lentamente porque de otra manera pueden generarse muchos vapores o incluso salpicar. Hacerlo



siempre dentro de una campana de extracción de gases.

- **Reactivo de yoduro alcalino:** se disuelven 35g de hidróxido sódico (o 50g de hidróxido potásico) y 30g de yoduro potásico (o 27g de yoduro sódico) en aproximadamente 50mL y luego se enrasan hasta 100mL en un matraz aforado. La solución se conserva en vidrio oscuro.
- **Sulfato anhidro de manganeso (II):** solución de 340g/L (o sulfato monohidratado de manganeso, solución de 380g/L): se disuelven 34g de sulfato anhidro de manganeso (II) (o 38g de sulfato monohidratado de manganeso) en 50mL y luego se enrassa a 100mL en un matraz aforado. Si no se observa clara se debe filtrar la disolución. La solución se conserva en vidrio oscuro.
- **Yodato potásico:** solución patrón de concentración 10mM. Se secan varios gramos de yodato potásico a 180°C, se pesan en una balanza analítica $0,3567 \pm 0,0003$ g y se disuelven hasta 1000mL en un matraz aforado.
- **Tiosulfato sódico:** solución de concentración 10mM. Se disuelven 2,5g de tiosulfato pentahidratado de sodio en agua desgasificada (ver anexo II) y se lleva a 1000mL. Se guarda en botella de vidrio oscuro.

Los reactivos se pesan en vasos de precipitado de 100mL. En caso que 100mL de reactivo alcalino y manganeso no sean suficientes, se deberán preparar en volúmenes de 1L (multiplicando los pesos

necesarios por 10) y para las pesadas se utilizarán vasos de precipitado de 1L y se utilizará una balanza granataria.

Valoración de la solución de tiosulfato:

En el Erlenmeyer se colocan 10mL de la solución de yodato potásico 10mM y se añaden 90mL de agua bidestilada medidos con una probeta. Se añaden 1mL de la solución de ácido sulfúrico y 1mL de la solución alcalina. Se valoran y la concentración de tiosulfato (c , expresada en mM) se calcula según la ecuación:

$$c = \frac{6 \times 10 \times 1,66}{V}$$

Donde:

V: es el volumen en mL de la solución de tiosulfato utilizada para la valoración.

La solución de tiosulfato se valorará diariamente.

LIMPIEZA DEL MATERIAL

El material se limpiará con agua destilada o bidestilada, y en caso que sospechemos la presencia de materia orgánica se debe utilizar mezcla crómica (ver anexo III como prepararla).



TOMA DE MUESTRAS, CONSERVACIÓN Y ALMACENAMIENTO

Para el muestreo es recomendable hacerlo entre dos personas, una para el muestreo y otra para fijar las muestras en el mismo momento que se toman. Las muestras para oxígeno disuelto se toman de las botellas Niskin después de recolectar las de gases como DMS y CO₂. Las muestras se toman por duplicado.

Para la obtención de la muestra se utiliza una manguera de silicona 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



DETERMINACIÓN DEL BLANCO

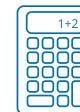
invertida e introducir el tubo hasta el fondo del mismo. Enjuagar el matraz y su tapa con la muestra dos veces. Poner la botella en posición vertical y permitir que el agua desborde.

Para calcular cuánta agua debe rebosar, estimar primero cuánto 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 (hay que tener en cuenta la disponibilidad de agua que tengamos, hay veces que está muy restringida). Para retirar la manguera, cerramos el flujo y retiramos la manguera de la botella con cuidado.

Colocar cuidadosamente la tapa correspondiente al matraz, sin que queden burbujas dentro del mismo. Para ello se inclina la botella y se deja caer la tapa en el sentido contrario al biselado. Lo antes posible se le añadirán los reactivos: 1mL de la solución de sulfato manganoso (II) y 1mL del reactivo alcalino. Se cierran las botellas nuevamente sin dejar burbujas, se agitan al menos 15 veces.

Permitir que se forme el precipitado después de 20 minutos y agitar nuevamente.

Guardar el matraz a temperatura ambiente protegido de la luz en las cajas de plástico cerrada. Analizar las muestras en un periodo no mayor de 24 horas después de la captación.



VALORACIÓN DE LA MUESTRA Y CÁLCULO DE LOS RESULTADOS

Asegúrándonos que el precipitado se encuentra en el tercio inferior de la botella, añadimos 1mL de la solución de ácido sulfúrico, se cierra sin dejar burbujas y se agita para que se disuelva todo el precipitado.

En nuestro caso las botellas tienen volumen libre suficiente para poder valorar directamente, pero en caso que no tengan suficiente, se transfiere el volumen a un Erlenmeyer. Se coloca en el agitador la botella y se le añade el agitador magnético. Se introduce el electrodo de Pt y el dispensador en la muestra y se procede a correr el programa de valoración.

El contenido del oxígeno disuelto, expresado en mg/L, se obtiene por la fórmula:

$$\frac{Mr \cdot V' \cdot c \cdot f}{4V''}$$

Donde:

Mr: masa molecular relativa de oxígeno (Mr=32)

V': volumen (mL) de la muestra de ensayo o la parte alícuota ($V' = V^o$ si todo el contenido de la botella estuviera titulado)

V: volumen (mL) de la solución de tiosulfato sódico utilizado para valorar el contenido del matraz o la parte alícuota

c: concentración real (mM) de la solución de tiosulfato sódico.

$$f = \frac{V^o}{V^o - V^a}$$

Donde:

V^o : volumen (mL) de la botella

V^a : la suma de los volúmenes añadidos de las soluciones de sulfato manganoso (II) y del reactivo alcalino.

El resultado se expresa con un decimal.

2

MEDICIONES UTILIZANDO EL VALORADOR TITRINO

Para las mediciones de las muestras se puede controlar el valorador desde el ordenador o desde el propio equipo. A continuación se detalla el controlador desde el titrino.



UTILIZACIÓN DEL TITRINO Y TECLADO

En este caso se controla la valoración desde el propio valorador y utilizando el teclado. El método ya está guardado en el equipo y solo deberemos introducir las variables necesarias (como concentración de patrón, volúmenes, etc.). En caso que no esté cargado el método se debe consultar el manual del equipo.

Debemos siempre comprobar que al introducir la muestra esté el agitador magnético dentro y que el agitador del sistema esté encendido. El electrodo y el dispensador de tiosulfato deben quedar sumergidos.

Antes de comenzar debemos vaciar y llenar manualmente al menos 2 veces la bureta, para ello en el titrino directamente en la tecla 'DOS' y cuando se ha vaciado en 'FILL'.

1. Primero procedemos a valorar el tiosulfato utilizando el patrón preparado, para ello seguimos los siguientes pasos:

User method

Cargar method- Enter

Con la tecla '→' seleccionamos el método, en este caso 'Standard'.

Corremos el método apretando la tecla Start y guardamos el volumen de tiosulfato que se ha utilizado.

2. A continuación procederemos a valorar las muestras, para ello seguimos los siguientes pasos:

En el teclado seleccionamos **CONFIG.**
Variables comunes.

C31: introducimos el volumen de tiosulfato que hemos utilizado para valorar 10 mL de patrón de yodato. ¡No tocar nada más!

User method

Cargar method- Enter

Con la tecla '→' seleccionamos el método, en este caso '**Det 02**'.

En el teclado seleccionamos **SMPL Data**

En este menú podremos introducir datos de la muestra como por ejemplo: **C21** es el número de estación, **C22** número de botella niskin y **C23** el número de la botella de muestra (que no son los que vamos a utilizar en el laboratorio normalmente), en este menú introduciremos en peso el volumen de la botella que tiene marcado, y en unidad de peso seleccionamos mL.

Una vez seleccionados le damos a **Quit** para entrar en la pantalla donde veremos los datos de mediciones anteriores, al dar a **Start** comenzará la valoración.

Si al finalizar la valoración aparece el mensaje 'error 42' puede ser que no esté conectada la impresora, pero podremos saltarlo volviendo a presionar **Quit**.

De los datos que aparecen apuntamos el valor de volumen de tiosulfato gastado para los cálculos de mg/L de oxígeno.

Sacamos la muestra, limpiamos el electrodo y colocamos la siguiente muestra con el agitador magnético.

3

REFERENCIAS

- Knap, A., A. Michaels, A. Close, H. Ducklow and A. Dickson (eds.) 1996. *Protocols for the Joint Global Ocean Flux Study (JGOFS) Core Measurements*. JGOFS Report Nº 19.
- UNE-EN 25813:1994. *Calidad del agua. Determinación del oxígeno disuelto. Método yodométrico. (ISO 5813:1983)*

4

ANEXOS

ANEXO I: DETERMINACIÓN DEL VOLUMEN DE LAS BOTELLAS PARA LA TOMA DE MUESTRAS

Es importante que el volumen de las muestras sea lo más preciso posible. En caso que no sea conocido, se deberá seguir el siguiente procedimiento:

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

$$V(\text{mL}) = \frac{P_2 - P_1}{D}$$

Donde

P1: peso de la botella vacía (g).
P2: peso de la botella con agua destilada (g).
D: densidad del agua destilada a la temperatura de la medición (g/mL).

La densidad del agua destilada a diferentes temperaturas se muestra en la Tabla a continuación:

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

ANEXO II: DESGASIFICACIÓN DEL AGUA UTILIZANDO EL BAÑO ULTRASÓNICO

Colocaremos una botella abierta en el baño ultrasónico al menos durante 15 minutos. Hay que comprobar que el nivel de agua del baño sea el adecuado.

ANEXO III: PREPARACIÓN DE MEZCLA CRÓMICA

La mezcla crómica se prepara añadiendo unos 20g de dicromato sódico o potásico a 1L de ácido sulfúrico concentrado, formando una disolución saturada. Se deja en reposo todo una noche y se decanta la disolución clara en una botella bien cerrada.

Se deja el recipiente a limpiar durante toda la noche lleno de la mezcla crómica. Al día siguiente se vuelve a recoger la mezcla en una botella de vidrio, que debe permanecer bien cerrada, donde se conserva para nuevos usos. Esta solución puede utilizarse varias veces hasta que adquiera un color verdoso, momento en que se desecha.

Cuando se utilice la mezcla crómica se deben tener en cuenta varias cosas:

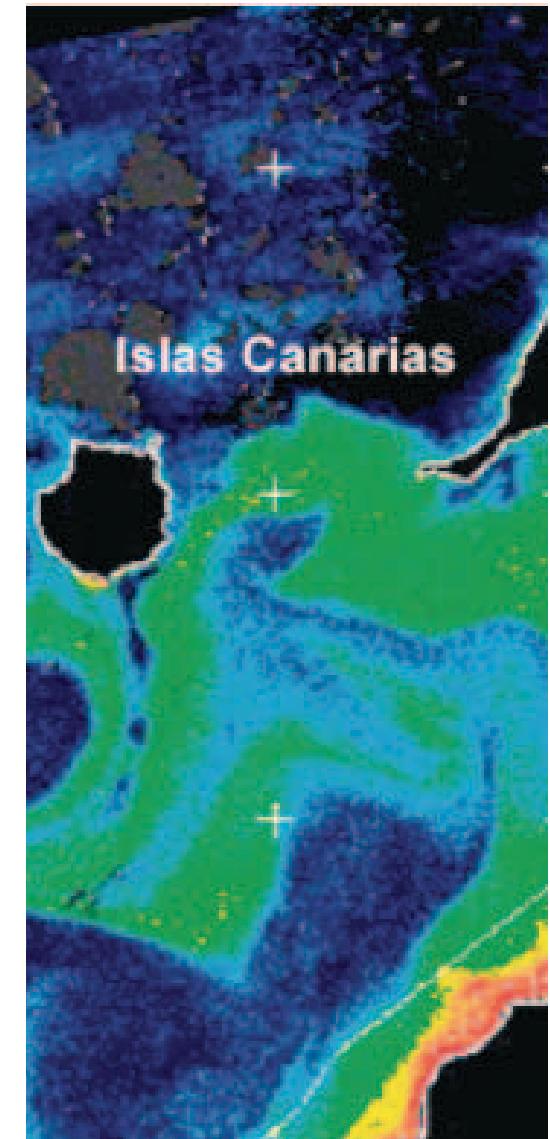
- Es necesario enjuagar muy bien los recipientes después de utilizar la mezcla crómica, ya que esta se adhiere a las paredes del recipiente.
- La disolución limpiadora, especialmente cuando está caliente, es una preparación potencialmente peligrosa que ataca con gran velocidad la materia vegetal o animal. Por ello, debe manejarse con el debido respeto. Cualquier salpicadura debe ser rápidamente secada y diluida con abundante agua. Además siempre se debe manipular el material con guantes y llevando puesto la bata de laboratorio y gafas para posibles salpicaduras.

Debido a su alta capacidad oxidativa, los residuos deben ser gestionados adecuadamente, incluso el agua de la limpieza debe depositarse en el mismo recipiente de residuos y no tirarlo por el fregadero.

PTL-ChL:

DETERMINACIÓN DE CLOROFILA a POR FLUORIMETRÍA.

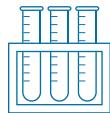
(Anexo para la determinación
por espectrofotometría)



1

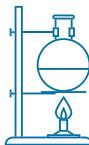
PROCEDIMIENTO DE RECOGIDA Y TRATAMIENTO DE LAS MUESTRAS

Para la determinación de clorofila presente en el fitoplancton en un volumen de agua conocido, se sigue el método establecido por la EPA (Método 445.0) y los protocolos del Joint Global Ocean Flux Study (JGOFS).



MATERIAL NECESARIO

- Fluorómetro Turner Desing 10-AU equipado con los filtros de excitación (CS-5-60) y emisión (CS-2-64).
- Cubetas de vidrio para el fluorómetro.
- Centrífuga Jouan BR311
- Pinzas de laboratorio
- Filtros de fibra de vidrio 47mm de diámetro y 0.7µm de tamaño de poro.
- Sistema de filtración, bomba de vacío y recipiente para residuos
- Papel de aluminio
- Tubos de vidrio con rosca previamente lavados.
- Botellas oscuras de PE limpias de 1L
- Probetas graduadas de 500 y 1000mL
- Matraces aforados de 100 y 1000mL
- Balanza de precisión



REACTIVOS Y ESTÁNDARES

Los reactivos necesarios serán los siguientes:

- **Acetona calidad HPLC:** Se utilizará para preparar acetona al 90%, añadiendo en 100mL de agua bidestilada en primer lugar en la botella donde se guardará el reactivo y posteriormente los 900mL de acetona medidos con la ayuda de una probeta de 1000mL.
- **Stock de clorofila:** se utiliza el estándar de la casa Biosigma.
- **Estándares de clorofila:** Se prepara un patrón primario en acetona de 10ppm. El patrón secundario de 1ppm se prepara en acetona al 90% and igual que los terciarios.
- **Blanco de reactivos:** Se determina llevando a cabo el mismo procedimiento pero para un filtro blanco.



LIMPIEZA DEL MATERIAL

El material se recomienda lavarlo de la siguiente manera: dejar 4h en jabón, enjuagar con agua del chorro, posteriormente con agua bidestilada y por último con acetona. Se debe asegurar que el material a utilizar no tenga restos de ácidos.



TOMA DE MUESTRAS, CONSERVACIÓN Y ALMACENAMIENTO

El tamaño de la muestra dependerá de las cantidades de clorofillas presentes en las aguas, pudiendo ser hasta 4L para aguas más oligotróficas. En nuestro caso, se filtran 0,5L de muestra. La muestra se toma en las botellas oscuras y se debe filtrar lo antes que sea posible (al menos el mismo día de muestreo). Antes de filtrar se deberá homogenizar la muestra, sin llegar a



CONTROL DE CALIDAD

- Linealidad del método:** Se deben analizar al menos 5 estándares que se encuentran en el rango de 0,2-200 µg/L de clorofila. En nuestro caso se utilizan los siguientes patrones (se incluyen los volúmenes que se deben tomar a partir del patrón secundario de 1ppm para obtener un volumen final de 100mL):

Conc. Patrones terciarios (µg/L)	50	35	25	15	5	2,5	0
Vol. del patrón secundario (mL)	5	3,5	2,5	1,5	0,5	0,25	0

- Estimación del Límite de Detección (LD):** Se deben medir al menos 10 blancos de filtros siguiendo el procedimiento de extracción que se le aplica a las muestras. El valor del LD será 3 veces la media de estos resultados.



PROCEDIMIENTO DE EXTRACCIÓN

En un laboratorio con iluminación mínima, se le añadirán a las muestras 10mL de acetona al 90%, se agitarán vigorosamente y se volverán a colocar en la oscuridad a 4°C y se medirán antes de las 24h.

En el momento de la medición se volverán a agitar, se dejarán reposar al menos 30min (para atemperar) y ya se coloca la muestra en las cubetas de vidrio para medir.



CÁLCULOS DE LAS CONCENTRACIONES

La concentración de clorofila a corregida (CC en µg/L) se calcula según la siguiente ecuación:

$$CC = CE \times \left(\frac{VE}{VM} \right)$$

Donde:

CE: concentración en el extracto que nos da el equipo (µg/L)

VE: Volumen del extracto (volumen de acetona 90% añadido, que en nuestro caso son 10mL) VM: Volumen de la muestra filtrada (en nuestro caso serían 500mL)

2

MEDICIONES UTILIZANDO EL FLUORÓMETRO 10-AU

MATERIAL NECESARIO

Una vez han pasado las 24h después de dejar las muestras en acetona al 90%, la concentración de clorofila es determinada. Para este paso será necesario lo siguiente:

- Acetona 90%
- Tubos para colocar las muestras

AJUSTE DEL EQUIPO

Este procedimiento debe aplicarse la primera vez que el técnico utiliza el equipo o cada vez que se va a utilizar una aplicación diferente y cuando se cambian los filtros o las lámparas.

1. **Encendido del equipo:** encender el equipo en el botón rojo y esperar al menos 30 minutos.

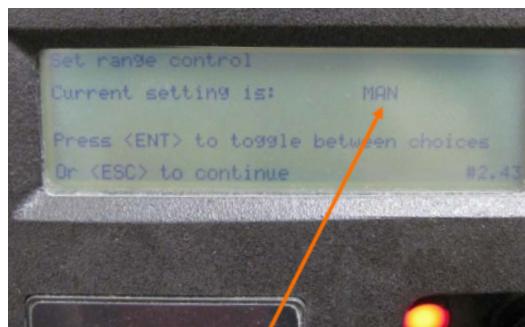


2. **Ajuste de la sensibilidad del equipo:** Se debe utilizar el rango apropiado de %FS, para ello se debe determinar experimentalmente para las calibraciones. En la tabla adjunta (tomada del manual de usuario del equipo) se tiene un ejemplo, si tomamos un patrón de 20µg/L podemos ver el Rango y %FS que debemos elegir.

CHLOROPHYLL (µg/l)	RHODAMINE WT (ppb)	RANGE	%FS (+/-5)
240 - 180	100 - 7.5	High	80%
180 - 160	75 - 6.5	High	70%
160 - 130	65 - 5.5	High	60%
130 - 110	55 - 4.5	High	50%
110 - 80	45 - 3.5	High	40%
80 - 60	35 - 2.5	High	30%
64 - 40	25 - 1.5	High	20%
24 - 18	10 - 7.5	Medium	80%
18 - 16	7.5 - 6.5	Medium	70%
16 - 13	6.5 - 5.5	Medium	60%
13 - 11	5.5 - 4.5	Medium	50%
11 - 8.0	4.5 - 3.5	Medium	40%
8.0 - 6.0	3.5 - 2.5	Medium	30%
6.0 - 4.0	2.5 - 1.5	Medium	20%
2.4 - 1.8	1.0 - 0.75	Low	80%
1.8 - 1.6	0.75 - 0.65	Low	70%
1.6 - 1.3	0.65 - 0.55	Low	60%
1.3 - 1.1	0.55 - 0.45	Low	50%
1.1 - 0.8	0.45 - 0.35	Low	40%
0.8 - 0.6	0.35 - 0.25	Low	30%
0.6 - 0.4	0.25 - 0.15	Low	20%

3. Preparar estándares y el blanco de acetona.
4. Borrar las calibraciones anteriores en el menú 2.6

5. Acceder al menú 2.43 y seleccionar en 'Range control' la opción MAN (manual). Luego se debe elegir el nivel apropiado para el estándar (ver tabla epígrafe anterior) en el menú 2.42, que en nuestro caso podría ser MED (médium).



6. **Ajuste de la sensibilidad:** Para ello accedemos al menú 3.2 y con ayuda de la llave allen aflojamos el seguro.

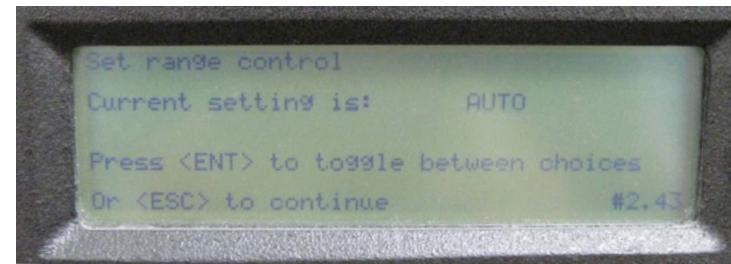


Colocamos y tapamos el estándar de $20\mu\text{g/L}$. Utilizando el 'botón de sensibilidad' vamos ajustando el valor de %FS hasta que se alcance el valor deseado ($\pm 5\%$)

Una vez tengamos el valor deseado de %FS, volvemos a utilizar la llave allen para esta vez dejar ajustado el seguro.



7. Con estos pasos ya tenemos ajustada la sensibilidad del equipo para el rango de trabajo. Para finalizar debemos acceder al menú 2.43 y colocar el rango de control en AUTO.



De esta manera debemos tener activadas las siguientes opciones:



HACER EL BLANCO DEL INSTRUMENTO

Para hacer el blanco debemos entrar en el menú 2.1, y una vez tengamos colocados el blanco de acetona, presionamos la opción 1. En este menú también seleccionamos sustraer el blanco de las lecturas de las muestras (menú 2.12). Debemos esperar a que se estabilice y presionamos '0', esperamos 15 segundos y si el proceso ha sido satisfactorio, el equipo mostrará un mensaje 'Blank Finished'.

MEDICIONES DE LAS MUESTRAS

Una vez hemos completado los pasos anteriores, ya solo nos queda ir colocando las muestras y asegurarnos que hemos cerrado bien la tapa. Para comprobar que hemos realizado una buena calibración, debemos medir también patrones de concentraciones conocidas.



CALIBRAR CON EL ESTÁNDAR

Para la calibración entramos en el menú 2.2 y entramos la concentración de nuestro estándar real. Volvemos el menú 2.0.

Colocamos nuestro estándar en el equipo y cubrimos.

Presionamos '3' para leer el estándar (menú 2.3) y esperamos que se estabilice. Presionamos '*' para establecer el punto de calibrado. Esperamos 15 segundos y se debe recibir el mensaje 'Finished' para confirmar que se ha completado el proceso.

3

REFERENCIAS

- Knap, A., A. Michaels, A. Close, H. Ducklow and A. Dickson (eds.) 1996. *Protocols for the Joint Global Ocean Flux Study (JGOFS) Core Measurements*. JGOFS Report Nº 19.
- **EPA Method 445.0:** *In vitro Determination of Chlorophylls a and Pheophytin a in Marine and freshwater Algae by Fluorescence*. 1997.

4

ANEXOS

ANEXO I: MÉTODO ESPECTROFOTOMÉTRICO PARA LA DETERMINACIÓN DE CLOROFILA a.

Para la determinación de clorofila a y feofitina a presente en el fitoplancton en un volumen de agua conocido, se sigue el método establecido en Standard Methods 10200H y el método EPA 446.0.

MATERIAL NECESARIO

- Espectrofotómetro UV-6300PC
- Cubetas de 1, 5 y 10cm
- Sonicador Cole Parmer
- Centrífuga Jouan BR311
- Pinzas de laboratorio
- Filtros de fibra de vidrio 47mm de diámetro y 0.7µm de tamaño de poro.
- Sistema de filtración, bomba de vacío y recipiente para residuos
- Papel de aluminio
- Tubos de vidrio con rosca previamente lavados.
- Botellas oscuras de PE limpias de 1L
- Probetas graduadas de 500 y 1000mL
- Matraces aforados de 100 y 1000mL
- Balanza de precisión

PROCEDIMIENTO DE EXTRACCIÓN Y MEDIDA

En un laboratorio con iluminación mínima, se le añadirán a las muestras 10mL de acetona al 90%, se agitarán vigorosamente y se sonicarán durante 20 segundos. La punta que se ha colocado en el sonicador se limpiará con aproximadamente 1mL de la solución de acetona, y posteriormente se enrassará la muestra a 13mL. Estas se volverán a colocar en la oscuridad a 4°C para su extracción durante la noche.

Antes de la medida se centrifugarán las muestras al menos durante 20 minutos (siempre agitando bien antes de centrifugar para homogenizar). Con una pipeta transferimos el líquido sobrenadante a una cubeta limpia (se elige el tamaño de la cubeta teniendo en cuenta que el valor de absorbancia a 663nm se encuentre entre 0,1-1,0).

REACTIVOS Y ESTÁNDARES

Los reactivos se corresponden con los mismos que para el proceso por fluorometría, lo que se diferenciará en que se acidifica la muestra y por tanto el reactivo que habrá que preparar, además de los anteriores mencionados, será el siguiente:

- Ácido clorhídrico 0.1M (se prepara añadiendo 8,3mL de HCl calidad PA a 500mL de agua bidestilada y luego se enrassa en un matraz aforado hasta 1000mL)

Se medirán a varias longitudes de onda, dependiendo de si queremos los valores de clorofila a corregidos o no (la anchura de la rendija nunca debe ser mayor a 2nm):

- **Clorofila a corregida:** es cuando corregimos los valores con los de Feofitina, ya que en algunos casos puede afectar a los valores de absorbancia de la clorofila, ya que absorbe en la misma región. En este caso se medirán en las longitudes de onda: 750, 665, 663, 645 y 630nm (con esto obtenemos valores sin corregir y corregidos) → **Método de acidificación**.

- **Clorofila a sin corregir:** en este caso el método no es corregido con los valores de Feofitina. Las longitudes de onda serán 750, 663,645 y 630nm → **Método tricromático.**

Para las muestras medidas con corrección: una vez se hayan medido los valores a las longitudes de onda deseada, se añadirán 0,1mL de HCL 0,1M a la cubeta, se agitará vigorosamente, se deja reposar 90 segundos y vuelve a medir a las longitudes de onda establecidas.

Una vez medida la muestra la cubeta es lavada 2 veces con la solución de acetona.

Calcular las concentraciones de Clorofila a corregida y Feofitina a utilizando los valores corregidos

$$\text{Chl } a \text{ corregida } (\mu\text{g/L}) = \frac{26,7 (Abs664_b - Abs665_a) \times E \times F}{V \times L}$$

$$\text{Feofitina } a \text{ } (\mu\text{g/L}) = \frac{26,7 (1,7 \times Abs665_a - Abs664_b)}{V \times L}$$

Donde:

F: es el factor de dilución final, ya que en caso que el valor de absorbancia a 663nm es >0,99 debemos diluir la muestra hasta que entre en el rango.

E: volumen de acetona utilizada en la extracción (mL) V: volumen de muestra filtrada (mL)

L: paso de luz de la cubeta (cm)

665_a: Absorbancia corregida por la turbidez a 665nm después de la acidificación.
664_b: Absorbancia corregida por la turbidez a 663nm antes de la acidificación.

CÁLCULOS DE LAS CONCENTRACIONES

1. Para valores de Clorofila a sin corregir:

Se determinan las absorbancias a 750, 664, 647 y 630nm.

Se sustrae el valor a 750nm a los de 630, 647 y 664nm → *corrección de turbidez*.

El valor de concentración de Clorofila a sin corregir se determinan según la siguiente fórmula, donde los valores de absorbancia (Abs) son los corregidos:

$$\text{Chl } a \text{ sin corregir } (\mu\text{g/L}) = \frac{[11,85 (Abs664) - 1,54 (Abs647) - 0,8 (Abs630)] \times E \times F}{V \times L}$$

Donde:

F: es el factor de dilución final, ya que en caso que el valor de absorbancia a 663nm es >0,99 debemos diluir la muestra hasta que entre en el rango.

E: volumen de acetona utilizada en la extracción (mL) V: volumen de muestra filtrada (mL)

L: paso de luz de la cubeta (cm)

2. Para valores de Clorofila a corregidos:

Se determinan las absorbancias a 750, 664, 645 y 630nm antes y después de la acidificación.

Se sustrae el valor a 750nm a los de 630, 645 y 664nm a los valores antes de la acidificación → *corrección de turbidez*.

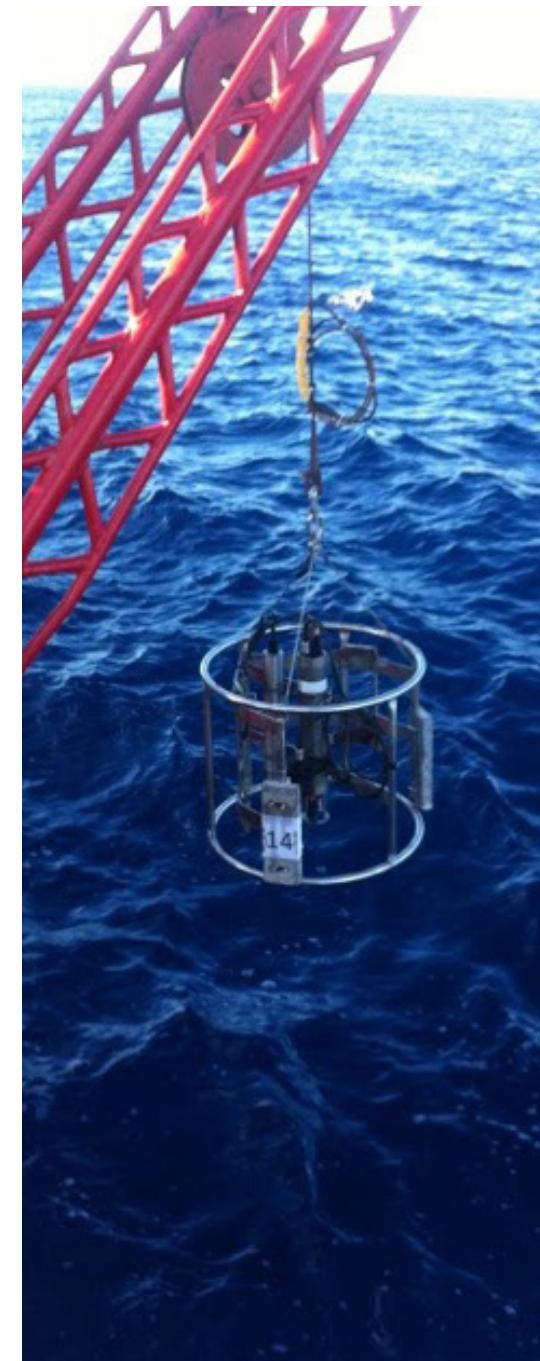
Se determinan las absorbancias a 665 y 750nm después de acidificar. Sustraer el valor de 750nm al de 665nm → *corrección de la turbidez*.

REFERENCIAS

- **EPA Method 446.0:** *In vitro Determination of Chlorophylls a, b, c1+c2 and Pheopigments in Marine and freshwater Algae by Visible Spectrophotometry.* 1997.
- **Method: 10200 H.** *Spectrophotometric Determination of Chlorophyll. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater.* APHA, 2001.

PTL-CTD:

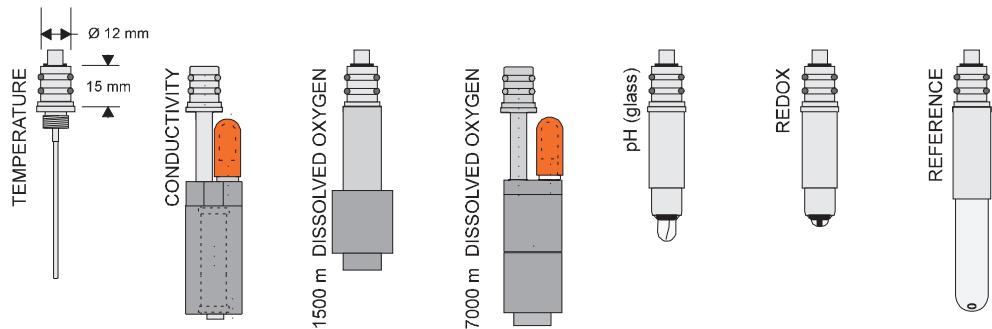
CALIBRACIÓN Y MANTENIMIENTO DEL CTD IDRONAUT SEVEN 316PLUS.



1

PROCEDIMIENTO DE RECOGIDA Y TRATAMIENTO DE LAS MUESTRAS

El CTD 316Plus posee sensores de presión, temperatura, conductividad, oxígeno y pH. Además posee incorporados un fluorómetro y turbidímetro de la casa Seapoint (no se posee sensor Redox). A continuación se muestran las características de los sensores de la casa Idronaut y un esquema de los mismos.



IDRONAUT SENSORS

	RANGE	ACCURACY	RESOLUTION	TIME CONSTANT
PRESSURE	0.. 1000 dbar*	0.05% full scale	0.002% full scale	50ms
TEMPERATURE	-3.. +50°C	0.002 °C	0.0002 °C	50ms
CONDUCTIVITY	0.. 70 mS/cm	0.003 mS/cm	0.0003 mS/cm	50 ms (at 1m/second flow rate)
OXYGEN	0.. 50 ppm	0.1 ppm	0.01 ppm	3 s (from nitrogen to air)
	0.. 500% sat.	1% sat.	0.1% sat.	3 s (from nitrogen to air)
pH	0.. 14 pH	0.01 pH	0.001 pH	3s
REDOX	-1000.. +1000 mV	1 mV	0.1 mV	3 s
AUXILIARY INPUTS**	0.. 5000 mV	1 mV	0.1 mV	50 ms

*Other standard pressure transducers, immediately available, have 10, 40, 100, 200, 500, 2000, 4000, 6000, 10000 dbar ranges.

Optionally, the IDRONAUT Highly Accurate Precise (0.01%FS) Pressure Transducer can be installed instead of the standard pressure transducer.

**Through the auxiliary inputs, optional sensors like: Fluorometer, Turbidity Meter, Transmissometer, Altimeter, Par, can be interfaced.

Six auxiliary analogue inputs are available inside the probe.

2 CALIBRACIONES

La casa posee un laboratorio de metroología donde se realizan las calibraciones de los sensores, pero algunos como los de pH y oxígeno necesitan ser calibrados antes de su uso, el resto solo podremos comprobar su funcionamiento.

IMPORTANTE: siempre debemos realizar estas calibraciones o comprobaciones en presencia del técnico responsable del CTD.

Para las calibraciones entraremos en el menú <CALB> en el 'Main Menu':

```
OCEAN SEVEN 316Plus – ID:[0430]{USR}(7.5_10-12/2006)
Tue Jan 02 12:48:32.64 2007
```

```
Calibration menu
<0> [CAUP] – Leave calibration menu
<1> [CASE] – Calibrate sensors
<2> [CACU] – Customize calibration data
<3> [CALO] – Calibration log
```

Una vez tenemos este mensaje en pantalla seleccionamos la opción que queremos, que será el número que se encuentra entre <> a la izquierda.

Si seleccionamos 1 para calibrar sensores y aparecerán los datos de las últimas calibraciones y los sensores que hay (ver imagen siguiente):

```
OCEAN SEVEN 316Plus – ID:[0430]{USR}(7.5_10-12/2006)
Thu Jan 04 11:33:18.81 2007
```

```
Sensors Calibration
Index Sensor Data&Time
00 – Leave sensor calibration
01 [ 0] 000 Press Thu Jan 04 11:33:04.81 2007
02 [ 1] 001 Temp Thu Jan 04 11:33:04.81 2007
03 [ 2] 002 Cond Thu Jan 04 11:33:04.81 2007
05 [ 3] 006 O2Sat% Thu Jan 04 11:33:04.81 2007
07 [ 4] 007 pH Thu Jan 04 11:33:04.81 2007
08 [ 5] 008 Eh Thu Jan 04 11:33:04.81 2007
Select the sensor: 0
```

De igual manera se selecciona el sensor que queremos calibrar.

SENSOR DE PRESIÓN

La calibración de este sensor siempre se debe realizar en los laboratorios de metroología. Aquí solo vamos a realizar el cero. Para ello sumergimos el CTD en agua hasta que de la carcasa que protege a los sensores quede aproximadamente 10cm fuera del agua.

Una vez que seleccionemos el sensor en el menú de calibración, aparecerá el siguiente mensaje:

```
Do you intend to review the calibration coefficents?
```

Seleccionamos <NO>, ya que <YES> será en el caso que queramos cambiar los valores de los coeficientes de calibración, y esos solo se deben obtener en laboratorios de metroología. Luego de seleccionar <NO> nos aparecerá el siguiente mensaje:

```
Pressure sensor calibration
Zeroing pressure offset – Immerse the probe and wait
few seconds to stabilize the
sensors temperature
Type <any key> To continue, <Esc> To leave
```

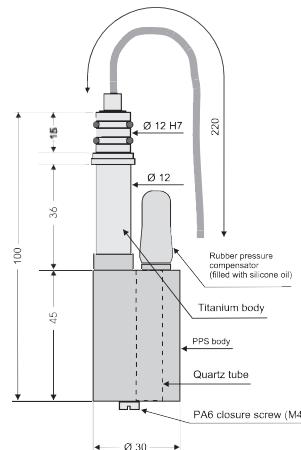
Presionamos <ESC> en caso que no queramos continuar con la calibración, pero para hacer el cero presionamos cualquier otra tecla y ya el CTD estará calibrando. Veremos el siguiente mensaje en pantalla:

```
Pressure calibration in progress
Calibatrion statistics
Sensor Offset – ADC counts dbar
111.0      0.8
```

Al final de la calibración el programa actualiza los valores de calibración y muestra el 'Calibration menu'.

SENSOR DE TEMPERATURA Y CONDUCTIVIDAD

Estos sensores se deben calibrar en los laboratorios de metrología de la casa una vez al año.

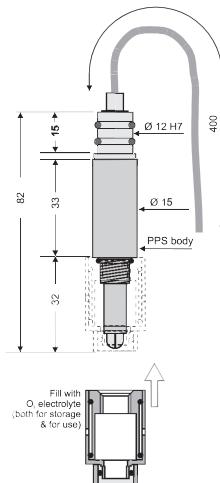


SIMPLE COMPROBACIÓN DE LA CALIBRACIÓN DEL SENSOR DE CONDUCTIVIDAD

El sensor de conductividad es muy estable y la mayoría del tiempo es muy preciso. Pero en caso que queramos comprobar su correcto funcionamiento utilizaremos los estándares de agua de mar IAPSO. Para ello limpiamos bien toda la sonda y la secamos, para que no queden restos ni de sales ni de agua y la sumergimos en un vaso de precipitado que contenga el estándar y un agitador magnético. Entramos en el menú de medida y comprobamos que la temperatura y conductividad sean los valores que se han establecido para este estándar. Los valores de conductividad deben ser muy similares a los del estándar, y en caso que exista una diferencia considerable, se deberá mandar a la casa.

SENSOR DE OXÍGENO

El sensor de oxígeno es el que más cuidado requiere. Para mantenimiento ver sección posterior.



La calibración del sensor de oxígeno se debe realizar siempre:

- Despues de un período largo sin usarse
- Una vez al día si está llevándose a cabo una campaña de larga duración
- Una vez al mes si está colocado en una boya de medición en continuo.
- Cuando se cambian la membrana y electrolito.

Para calibrar es preferible utilizar una disolución de agua destilada saturada en oxígeno y comprobar mediante el método Winkler el valor, pero es difícil obtener una disolución estable saturada, por ese motivo la calibración se llevará a cabo en el aire.

Una vez se seleccione el sensor en el menú de calibración, nos aparecerá el siguiente mensaje:

O2sat% sensor calibration
Gently wipe O2 membrane and Temperature sensor
Type <any key> To continue, <Esc> To leave

Antes de comenzar, nos aseguramos que el sensor esté bien seco y que a simple vista no se observen suciedades en la membrana, también que nos encontramos en un lugar bien ventilado y donde no existan fuentes de calor y no le dé al sensor directamente los rayos del sol. Una vez haya pasado al menos 1 minutos en ese lugar, pasamos a la calibración y aparecerá el siguiente mensaje:

Oxygen calibration in progress
Calibration statistics

Sensor Current	%Last cal.	Drift	Temperature
64.80 nA	118.8%	19.6	18.013 C
Count			

'% Last Cal' Se obtiene ($\text{cal.nueva}/\text{cal.anterior} * 100$) y nos puede dar una idea del estado de la membrana. 'Drift' es la deriva del sensor y en caso que sea muy grande nos aparecerá el siguiente mensaje:

Oxygen sensor error, see Operator's Manual

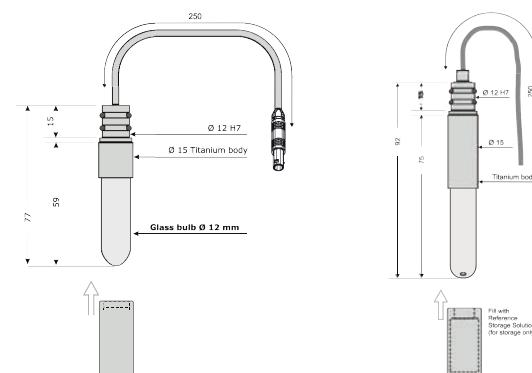
Cuando esto ocurra deberemos cambiar la membrana y el electrolito. En caso que no ocurra, la calibración se realiza y deberemos entrar el coeficiente de corrección de la presión atmosférica. Como se realiza a nivel del mal el coeficiente tomará valor 1. Para otros casos consultar el manual. Una vez se haya realizado la calibración adecuadamente, podremos pasar al modo de medida y comprobar si está trabajando bien el

sensor. Para ello podremos comprobar los valores que da en muestras reales y con una muestra de 0% de saturación de oxígeno.

La muestra de 0% saturación se prepara añadiendo 17g de sulfito de sodio a 125mL de agua (solución saturada). Esta disolución se coloca en un vaso de precipitado y se sumerge la sonda en ella, el valor va a ir disminuyendo lentamente, y pasados unos minutos se acepta como bueno valores menores al 10% de saturación.

Para comprobar las medidas con muestras reales, lo más adecuado es colocar la sonda en el tanque, y colocar un tubo de silicona para tomar las muestras para el Winkler de tal manera que se intente coger el agua lo más cercano a los sensores y que sean lo más representativas de lo que está midiendo. Debido a que el sensor al medir va consumiendo el oxígeno alrededor de la membrana, debemos mover la sonda para desplazar el agua que se ha ido empobreciendo en oxígeno y cuando vuelva a los valores normales, entonces tomaremos la muestra de agua para el Winkler. Si los valores obtenidos por ambos procedimientos son muy diferentes se deberá proceder a cambiar la membrana y electrolito, esto también se debe hacer cuando las medidas son reproducibles, pero las diferencias entre las medidas por un método y por otro son altas. (Para medidas de oxígeno por el método Winkler seguir las instrucciones del método PTL-O₂).

SENSOR DE PH Y DE REFERENCIA



La calibración del sensor se lleva a cabo utilizando un buffer de pH 7, un buffer de pH 4 puede utilizarse también para después realizar la comprobación de la calibración y el estado del sensor.

Una vez se seleccione el sensor de pH en el menú de calibración, deberemos introducir el valor del buffer:

pH Sensor calibration
pH buffer value: 7.0

Posteriormente saldrá el siguiente mensaje:

pH Sensor calibration
Place the buffer cup
Type any key to continue, <ESC> to abort.

Rellenamos el tubo del buffer con el de pH 7 e introducimos el sensor de pH y el electrodo de referencia, nos aseguramos que ambos estén bien sumergidos. Cuando estemos seguro presionamos cualquier tecla y comenzará la calibración.

Aparecerá el siguiente mensaje:

pH calibration in progress
Calibration statistics
Sensor offset – Drift Temperature
0.09pH 0.09pH 0.76mV 19.679

Cuando el valor del 'Sensor offset' del buffer de pH7 es ±0.6 se considerará que la calibración es buena, valores mayores requerirán revisión del estado del sensor (ver mantenimiento). Si la deriva fuese menor que el valor asignado automáticamente veremos un mensaje de error y volveremos al menú de calibración y el programa nos pedirá que entremos el valor de temperatura para hacer la corrección de la temperatura en los cálculos, ya que el pH del buffer puede variar en función de la temperatura (ver tabla a continuación):

TEMPERATURE (°C)	pH4	pH7
0	4.00	7.12
10	4.00	7.06
20	4.00	7.02
25	4.00	7.00
30	4.01	6.99
40	4.03	6.97
50	4.05	6.96
60	4.08	6.97
70	4.12	6.98
80	4.16	7.00
90	4.21	7.03

Una vez se haya calibrado el sensor medimos los buffers de 4 y 7 y comprobamos que se obtienen los valores esperados.

3

MANTENIMIENTO DE LOS SENSORES

SENSOR DE CONDUCTIVIDAD

Se debe limpiar utilizando el '*Conductivity sensor cleaning solution*' de la casa Idronaut.

SENSOR DE OXÍGENO

El sensor de oxígeno es el que más requiere un mantenimiento adecuado y continuo. El período teórico de vida del sensor es de 2 años si está trabajando en continuo y de 4 años si tiene un uso máximo de una vez por semana o diario.

- Se debe encender al menos 1 vez al mes en caso de que no se esté utilizando, para asegurar el buen funcionamiento de la batería que tiene. En caso que no se realice, es normal que tengamos problemas al intentar calibrar o trabajar con la sonda, para ello deberemos dejarlo un tiempo hasta que se stabilice.
- Se deben cambiar la membrana y electrolito cada vez que se vea que existe una diferencia significativa entre los valores que se obtienen con el sensor y los que se obtienen con el método Winkler.
- Para alargar la vida de la membrana es bueno dejarla en un recipiente con agua bidestilada para su almacenamiento.

SENSOR DE pH Y SENSOR DE REFERENCIA

El sensor de pH tiene una vida útil de 2 años en caso que se utilice para monitoreo o de 4 años en caso de que tenga un uso menor. Mientras se esté trabajando se almacena en buffer pH 7 y cuando se almacena para períodos más largos se deja en agua bidestilada.

En caso que veamos que ha permanecido un tiempo en la solución o que el tapón se ha secado, deberemos dejarlo de un día para otro en buffer pH7 para que se recupere a membrana. Si los problemas continúan podría pasar que la membrana está dañada, y para eso utilizamos la solución '*Sensor etching solution*'. Se colocará esta solución con la ayuda de guantes (ya que contiene ácido fluorhídrico) en el tapón y se sumerge el sensor durante unos 5 segundos, luego se enjuaga bien con agua para evitar que se dañe la membrana.

El sensor de referencia tiene una vida útil de 1 año en caso que se utilice para monitoreo o de 2 años en caso de que tenga un uso menor. Siempre se dejará almacenado en la solución '*Reference sensor storage solution*' que se corresponde con una solución 3M de KCl. En caso que no se tenga la de la casa Idronaut se podrá utilizar la que existe en los laboratorios para todos los sensores de pH.

Es muy importante para ambos sensores que siempre estén hidratados. Por tanto se debe vigilar que los tapones estén bien llenos de líquidos.



PLATAFORMA OCEÁNICA DE CANARIAS



Carretera de Taliarte, s/n.
35214 Telde - Las Palmas - España
Teléfono +34 928 134 414 • Fax: +34 928 133 032