

COLORIMETRIA



Cured.Bio



Attribution-ShareAlike 4.0 International
(CC BY-SA 4.0)

Colorimetria
Editat per Cured.Bio
Versió 0.1
Barcelona, 2018



1.	Introducció	2
2.	Colorimetria	4
2.1.	Definicions bàsiques.....	4
2.2.	Llei Beer-Lambert.....	6
2.3.	Coeficient d'extinció molar (ϵ)	8
3.	Cicle del nitrogen	9
3.1.	Les etapes del cicle del nitrogen	10
	Fixació del nitrogen	11
4.	Equació Henderson-Hasselbalch	13
5.	Estadística	15
6.	Rectes patró	16
6.1.	Colorants Alimentaris	17
	Protocol	17
6.2.	Determinació nitrats	19
6.2.1.	Amoníac/Amoni ($\text{NH}_3/\text{NH}_4^+$)	19
6.2.2.	Nitrat [NO_3^-]	24
6.2.3.	Nitrit [NO_2^-].....	29
7.	Discussió	33
7.1.	Conceptes	33
7.2.	Activitats.....	34
7.3.	Anàlisi	35
	Exemples de dades recollides en les activitats proposades	36
7.4.	Consells per a preparar l'activitat.....	39
8.	Bibliografia	40

1. INTRODUCCIÓ

Els indicadors de qualitat de l'aigua són eines que permeten assignar un valor de qualitat al medi a partir de l'anàlisi de diferents paràmetres. La seva combinació dona una visió més acurada de l'estat ecològic i l'estat del medi biològic. Aquests indicadors poden ser: biològics, hidromorfològics o fisicoquímics.

Els indicadors fisicoquímics es basen en la combinació de diferents paràmetres fisicoquímics (analits, pH, turbidesa, etc.) per donar una visió global de la qualitat de l'aigua. Alguns valors (com nitrats, amoni o fosfats) es poden veure alterats en funció de paràmetres mediambientals com l'oxigen dissolt, la temperatura, el pH, la quantitat de llum incident o la presència d'organismes microbiològics.

Per tal de mesurar la qualitat de l'aigua en relació a l'evolució d'un ecosistema, es possible utilitzar assajos colorimètrics. Aquest assajos són ràpids i econòmics, malgrat que no tenen una elevada repetibilitat donat que la mesura es fa per comparació subjectiva amb una escala colorimètrica. Addicionalment, aquest mètode té una resolució limitada, especialment amb concentracions elevades.

Per tal de solucionar aquests problemes, l'ús de la tecnologia esdevé un factor clau. En aquest sentit, l'ús d'un colorímetre equipat amb un sensor digital permet realitzar mesures més acurades. Addicionalment, la incorporació d'un microcontrolador, com Arduino, permet calcular les concentracions a partir de la transmitància detectada i l'ús de corbes patró.

NUTRIENT	MESURA SUBJECTIVA	COLORÍMETRE
Amoníac	0.50 ppm	0.47 ppm
Nitrit	0.00 ppm	0.00 ppm
Nitrat	80-160 ppm	111.75 ppm

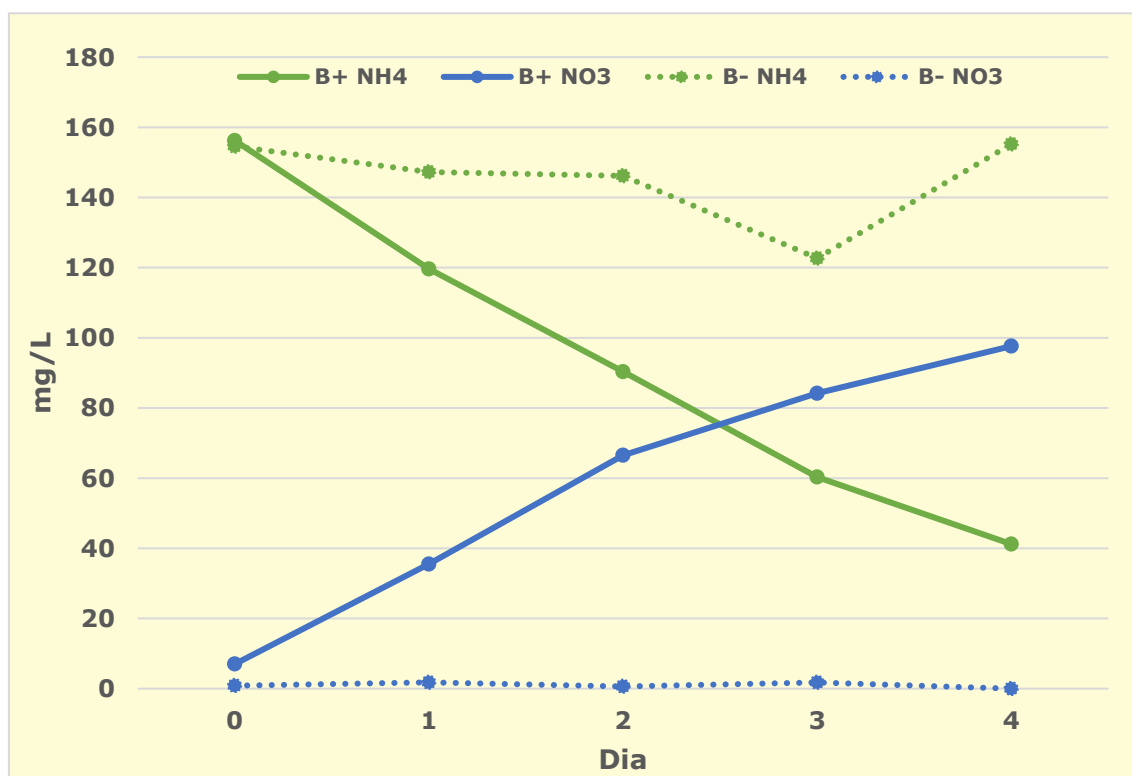


Un projecte que pot dur-se a terme a l'aula, és l'estudi d'un ecosistema tancat com un aquari. Amb pocs recursos, es possible veure l'evolució d'un aquari i estudiar-ne les variables que poden modificar la concentració dels analits.

El projecte requereix mesurar els diferents nivells d'amoni, nitrats i/o nitrits i pot dur-se a terme amb un aquari nou o un de ja establert. Addicionalment, es poden alterar el nombre d'individus o espècies (vertebrats, no vertebrats, vegetals), la temperatura o la llum per tal de validar les hipòtesis realitzades pels alumnes.

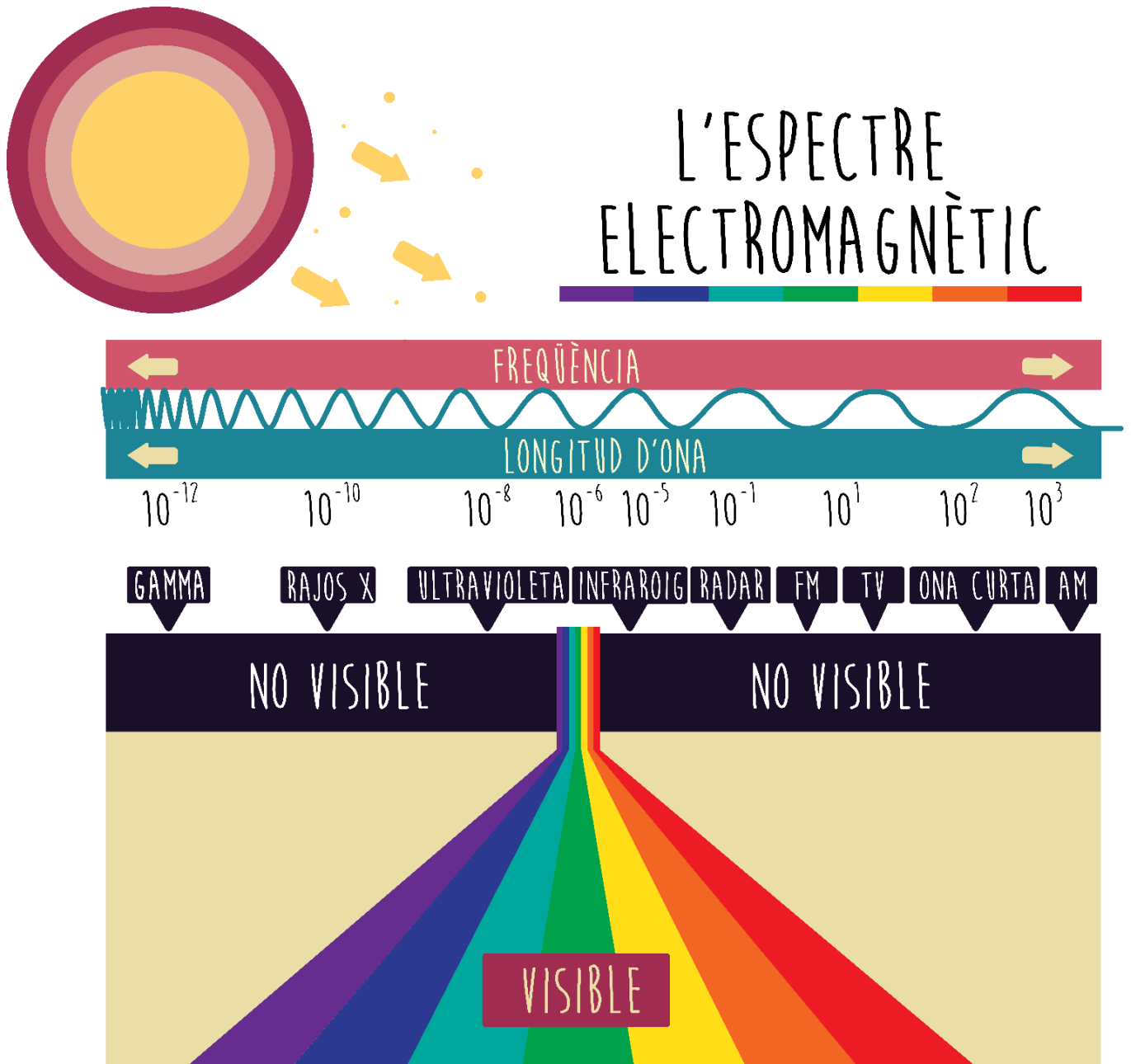
Els estudiants són els responsables de mesurar els diferents analits. Aquesta mesura es realitza en un període de 5-10 minuts i ha de repetir-se cada 24h durant un període de 4 dies. Les mostres han de ser analitzades per triplicat i enregistrades, per tal de poder ser analitzades al finalitzar l'experiment.

En el gràfic que es mostra a continuació, es poden veure les diferents mesures d'amoni i nitrat entre dos aquaris. Un d'aquests aquaris (línia contínua), conte bacteris nitrificadors donat que prové d'un ecosistema que ja ha assolit l'equilibri. L'altre aquari (línia discontinua), ha estat recentment creat i els bacteris nitrificadors no han pogut assolir la població necessària per a actuar com a filtre biològic de l'amoni i, conseqüentment, no es pot donar la conversió d'amoni (verd, NH_4) a nitrat (blau, NO_3^-).



2. COLORIMETRIA

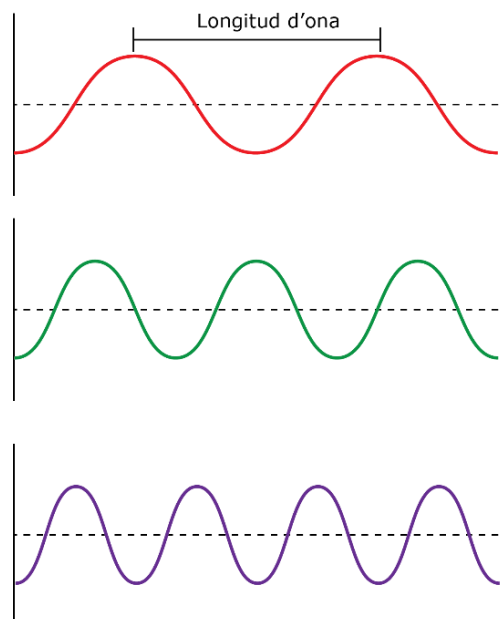
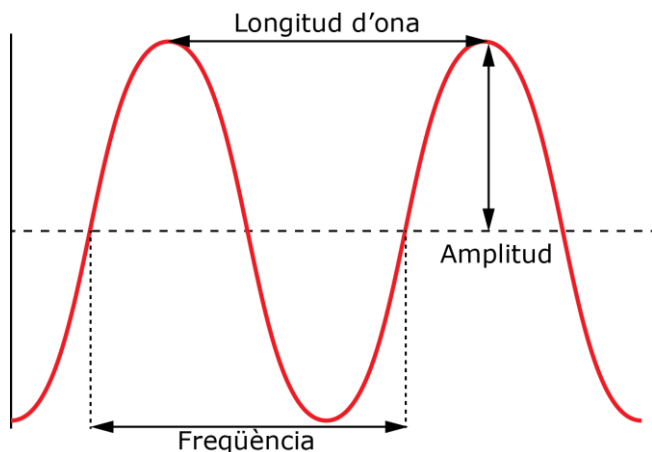
2.1. DEFINICIONS BÀSIQUES



La llum és la porció de l'espectre electromagnètic visible per l'ull humà, amb longituds d'ona entre 380 i els 780 nanòmetres (nm) dins l'espectre electromagnètic.

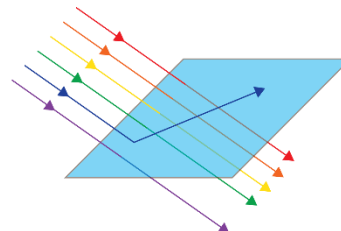
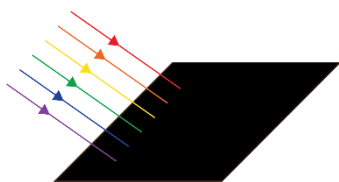
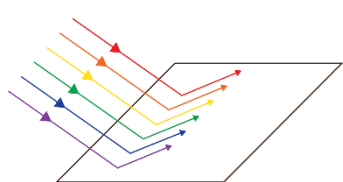
Les seves característiques bàsiques, són:

- Amplitud (brillantor)
- Freqüència (color)
- Angle de vibració (polarització)



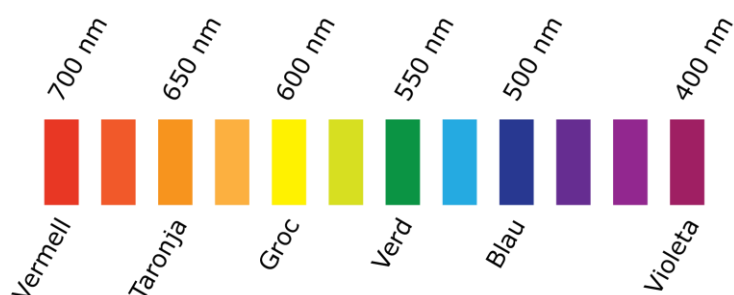
Quan la llum interfereix amb la matèria, pot succeir que:

- La llum sigui reflexada
- La llum sigui absorbida
- La llum sigui absorbida en certes longituds d'ona i la resta sigui transmesa sense alterar-se.



En el cas d'una mostra d'aigua, i mitjançant l'ús dels reactius químics adients, el color observable es degut a la absorció de determinades longituds d'ona i a la transmissió de les longituds d'ona restants. Es gràcies a aquesta transmissió que es possible determinar la concentració d'un analit determinat en una mostra d'aigua.

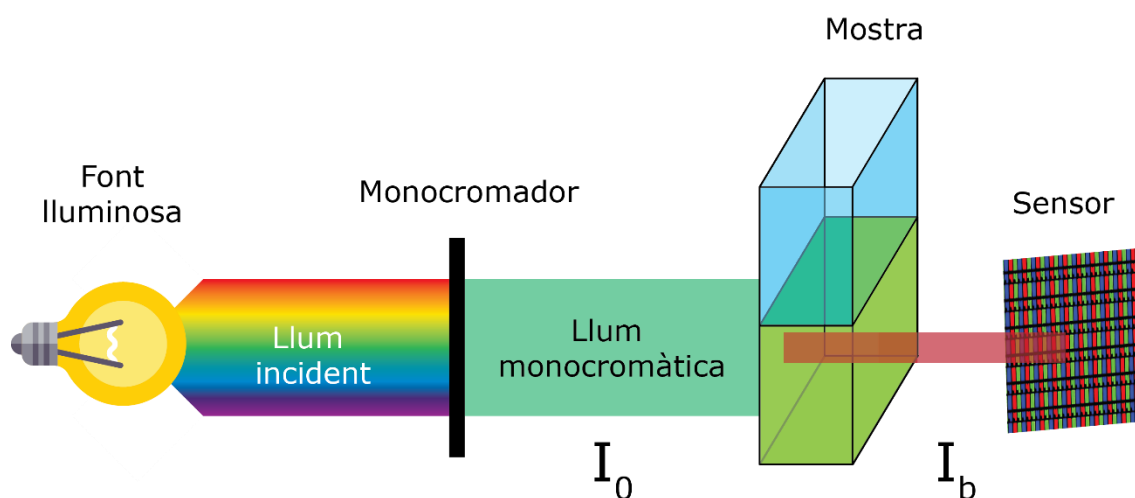
Suposem que il·luminem amb llum blanca una mostra que conte una molècula que absorbeix la llum de color verd. Donat que el component verd de la llum blanca es absorbit per la pròpia substància que dona color, la llum que es transmesa es majoritàriament de color vermell, el color complementari del verd. Aquesta llum vermella es la que els nostres ulls (o el colorímetre detecta). Les figures següents ajuden a identificar el color complementari i la seva longitud d'ona corresponent.



2.2. LLEI BEER-LAMBERT

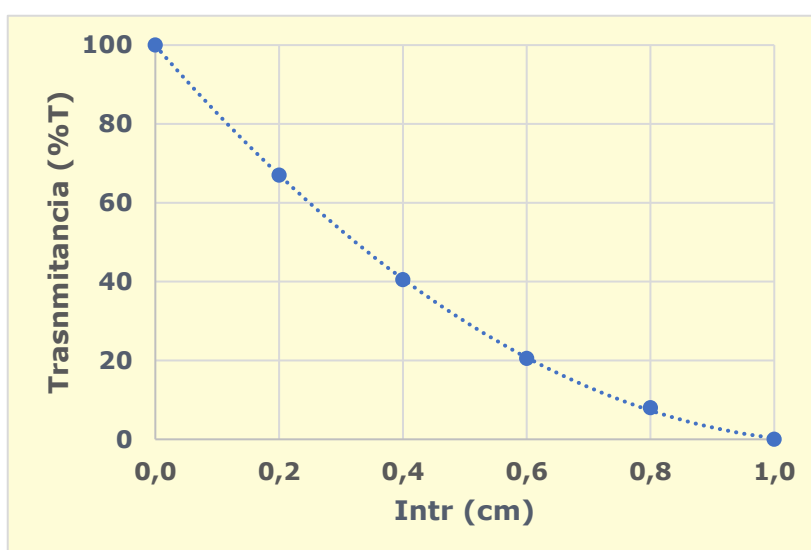
Per tal de conèixer la concentració d'una substància en un dissolvent determinat, poden emparar-se diferents mètodes. En aquest cas, amb l'ajut un colorímetre, es possible determinar la concentració mitjançant la llei de Beer-Lambert.

Un colorímetre i un espectrofotòmetre, son dispositius molt similars entre ells i que, per tant, es regeixen pel mateix principi de funcionament: la llei de Beer-Lambert. En ambdós casos, el dispositiu permet determinar la intensitat de la llum que passa a través d'una cubeta transparent que conte la mostra líquida. Aquesta mostra, absorirà major quantitat de llum quan major sigui la concentració de la substància dissolta. D'aquesta manera, quan es fa incidir un raig de llum d'una longitud d'ona (λ_{\max}) i intensitat determinada (I_0), de manera perpendicular, aquesta absorbeix part de la radiació. La resta de radiació (I), passa a través de la mostra i arriba al sensor.



Per tant, la transmissió (T) es defineix com la relació entre la intensitat de la llum que es transmesa al detector un cop a passat a través de la mostra (I) i la intensitat de llum inicial (I_0). Això es expressat mitjançant la següent fórmula i es expressada en forma de percentatge de llum transmesa:

$$T = \frac{I}{I_0}$$
$$T[\%] = \left(\frac{I}{I_0}\right) * 100$$

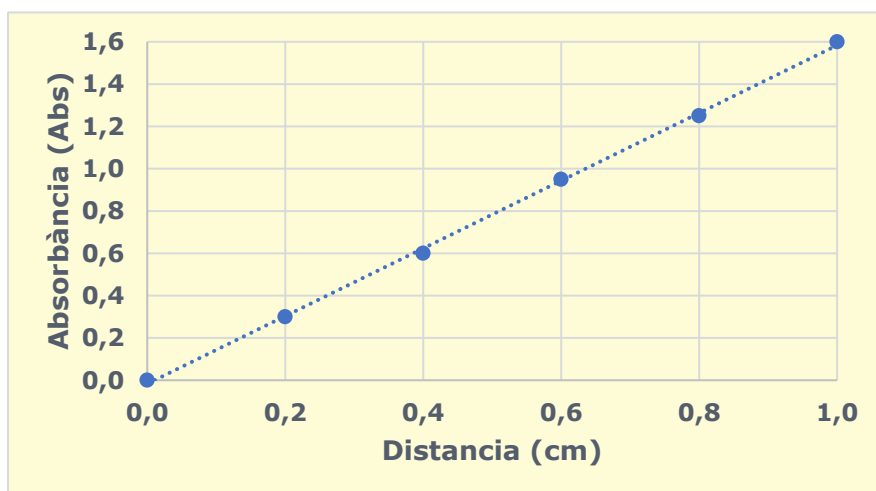


Per tal de conèixer la concentració de la dissolució, es necessari conèixer l'absorbància. L'absorbància (Abs) es defineix com el logaritme de la transmitància i es adimensional. La relació entre la transmitància (T) i l'absorbància (Abs) pot expressar-se com:

$$Abs = \log_{10} \left(\frac{1}{T} \right)$$

$$Abs = \log_{10} \left(\frac{100}{T[\%]} \right) =$$

$$= 2 - \log T[\%]$$



La llei Beer-Lambert defineix la relació entre la concentració d'una solució i la quantia de llum absorbida, tenint en compte la distància que la llum a recorregut a través de la mostra i el coeficient d'extinció molar (ϵ). D'aquesta manera es defineix que:

$$Abs = \epsilon * c * l$$

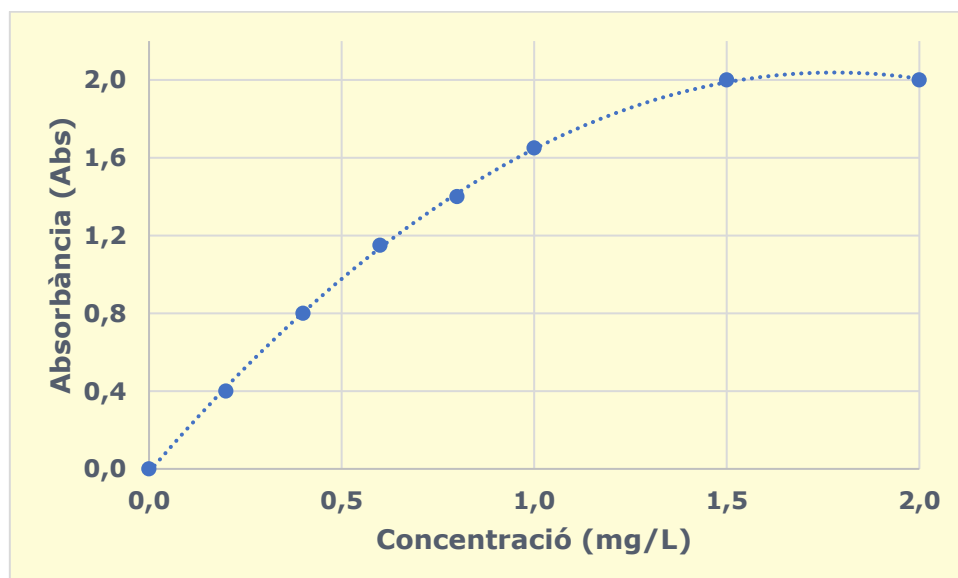
On,

A = Absorbància

ϵ = Coeficient d'extinció molar ($\frac{\text{litre}}{\text{mol} * \text{cm}}$)

d = Distància recorreguda per la llum a través de la mostra (cm)

C = Concentració del compost en la solució ($\frac{\text{mol}}{\text{litre}}$)



La llei Beer-Lambert no es compleix en elevades concentracions (Absorbància >2,0).

2.3. COEFICIENT D'EXTINCIÓ MOLAR (ϵ)

El coeficient d'extinció molar (ϵ) es la mesura que representa la capacitat d'un compost en una solució d'absorbir una longitud d'ona concreta.

L'ús d'aquest coeficient pot suposar un estalvi de temps i de reactius al laboratori. La llei Beer-Lambert diu que " $Abs = \epsilon c l$ ", a la longitud d'ona de màxima absorció (λ_{max}) del compost. D'aquesta manera, si es coneix l'absorbància (Abs) a la λ_{max} , la concentració de la mostra (c) i la distancia recorreguda (l) es possible determina el coeficient d'extinció molar (ϵ), tal que:

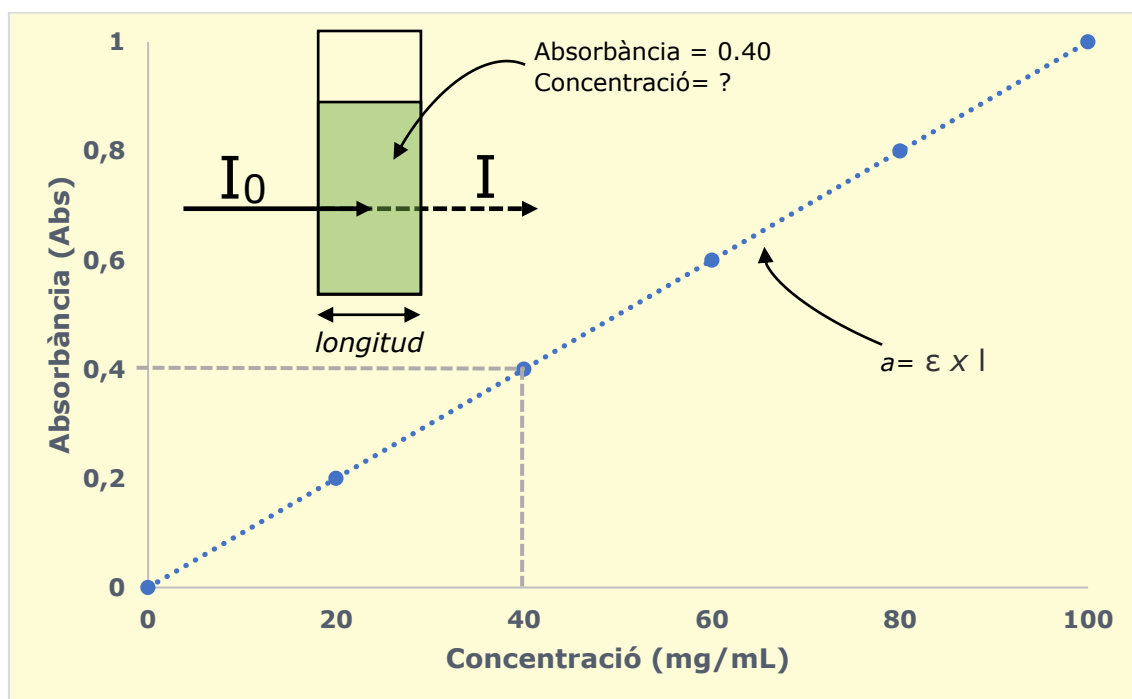
$$Abs = \epsilon * c * l$$

$$\epsilon = \frac{Abs}{c * l}$$

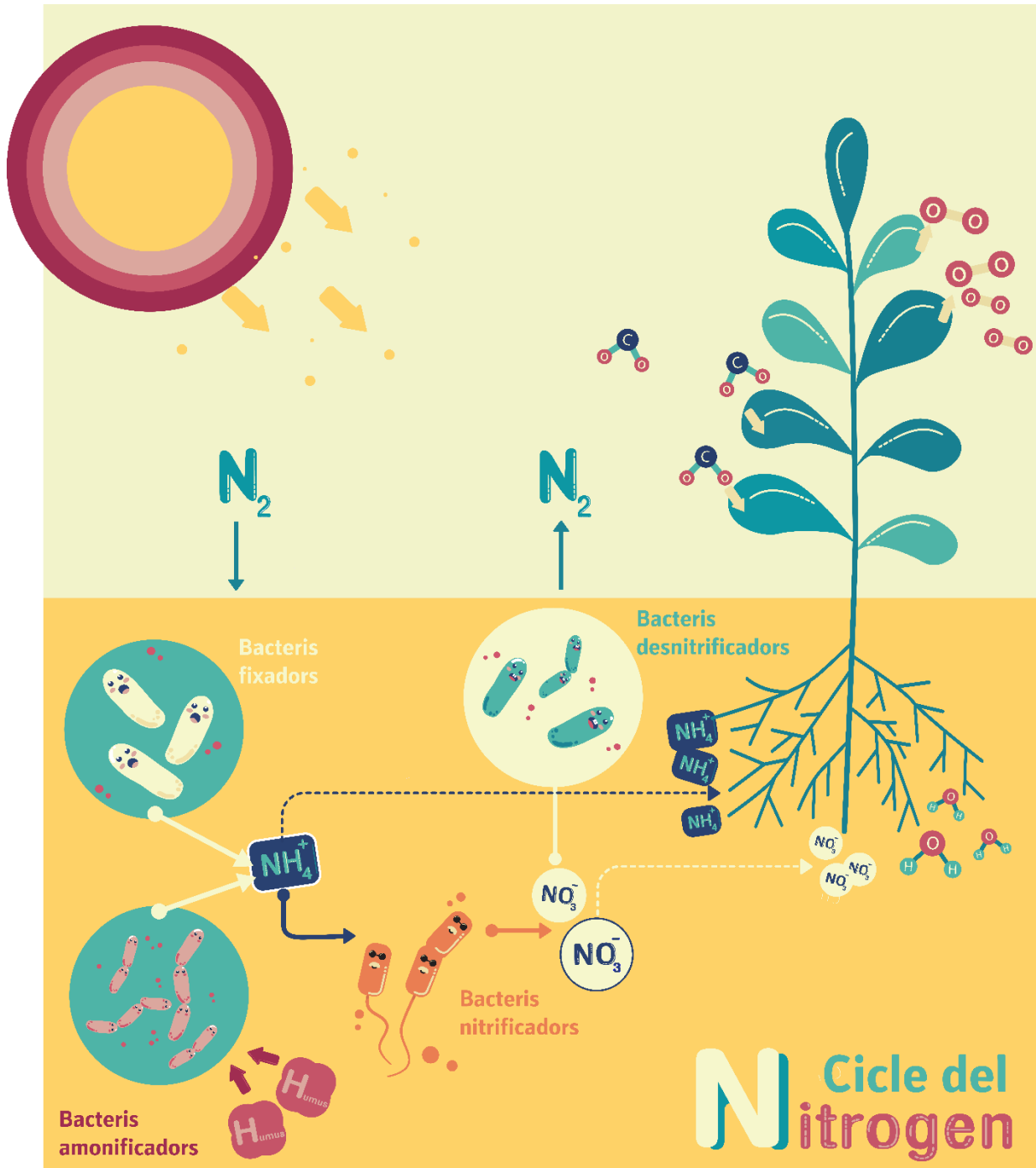
Cal tenir en compte que les cubetes d'espectrofotometria o colorimetria, tenen una mesura estàndard d'1cm. Per tant,

$$\epsilon = \frac{Abs}{c}$$

Un altre manera de determinar el coeficient d'extinció molar es mitjançant l'ús de rectes patró. Si es grafica l'absorbància de diferents mostres respecte la seva concentració (coneguda), es possible determinar la pendent de la recta. L'equació corresponent a aquesta recta respon a " $y = ax + b$ ", on " a " representa el pendent de la recta. Aquesta pendent es el producte del coeficient d'extinció molar i la longitud.



3. CICLE DEL NITROGEN



Sent un component essencial dels àcids nucleics i les proteïnes, el nitrogen (N) es un element clau per a la vida, tal i com la coneixem. Tot i ser un element abundant en l'atmosfera, en forma de dinitrogen (N_2), la seva assimilació per part dels organismes es limitada. Aquest fet, te conseqüències mediambientals (agricultura, eutrofització, etc.) i es per aquest motiu que es important conèixer el cicle del nitrogen.

El cicle del nitrogen es un procés pel qual el nitrogen es transformat en diferents compostos químics. Aquesta transformació es duta a terme tant per processos biològics com físics. El processos mes importants d'aquest cicle inclouen: la fixació, la amonificació, la nitrificació i la desnitrificació. La majoria de la atmosfera terrestre es nitrogen (78%), sent aquest el major reservori de nitrós. Tot i així, el nitrogen atmosfèric te una disponibilitat limitada per a l'ús biològic, de tal manera que, en molts ecosistemes, es un element que escasseja.

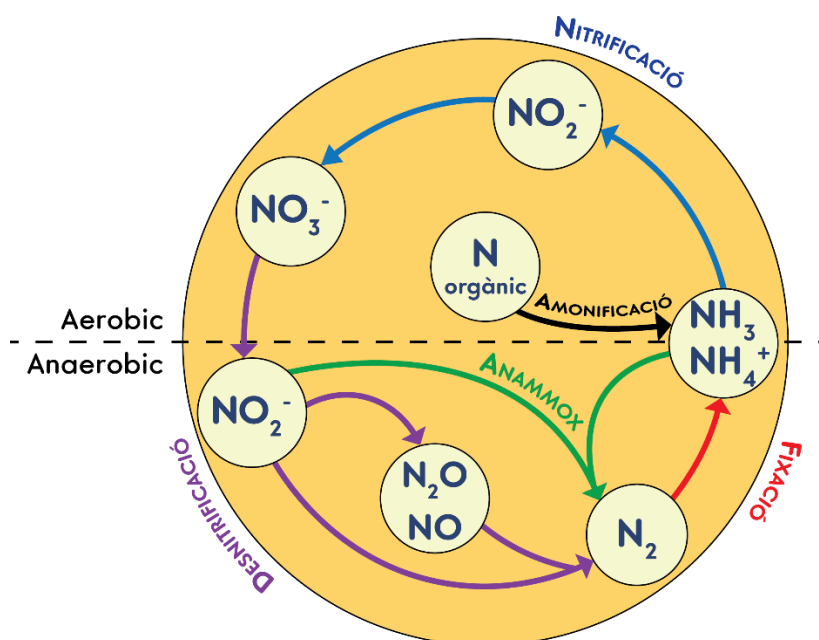
El cicle del nitrogen es de especial interès degut a que la seva disponibilitat afecta diferents processos en els ecosistemes, incloent la producció primària i la descomposició. Les activitats humanes, com la crema de combustibles fòssils, l'ús de fertilitzants artificials i l'alliberament descontrolat de components rics en nitrogen en aigües residuals pot comportar una alteració en el cicle del nitrogen.

3.1. LES ETAPES DEL CICLE DEL NITROGEN

El nitrogen es troba present en el medi ambient en una gran quantitat de formes incloent el nitrogen orgànic, l'amoni (NH_4^+), nitrit (NO_2^-), nitrat (NO_3^-), òxid nitrós (N_2O), òxid nítric (NO) o, en forma de gas com, nitrogen inorgànic (N_2). El nitrogen orgànic es pot trobar com a component de les proteïnes i els àcids nucleics, sent part dels organismes vius, organismes en descomposició o humus. El conjunt de processos que comporten la transformació d'un component a un altre s'anomena cicle del nitrogen. Molts d'aquest processos son duts a terme per microorganismes, ja sigui fent-lo servir com a font d'energia o com a component per al seu creixement.

En general, podem dir que el cicle del nitrogen es compona de 5 etapes:

- 1) Fixació del nitrogen (N_2 a NH_3 / NH_4^+ o NO_3^-)
- 2) Nitrificació (NH_3 a NO_2^- i de NO_2^- a NO_3^-)
- 3) Assimilació (Incorporació de NH_3 i NO_3^- en teixits biològics))
- 4) Amonificació (Nitrogen en forma orgànica a NH_3)
- 5) Desnitrificació (NO_2^- a N_2)
- 6) Anammox (NO_2^- a N_2)



1. Fixació del nitrogen

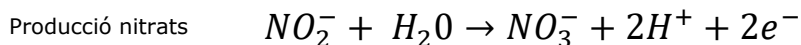
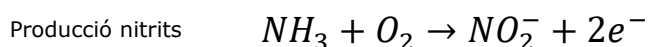
El nitrogen atmosfèric ha de ser processat, o "fixat", de tal forma que pugui ser utilitzat per les plantes. El dinitrogen (N_2) és una molècula molt inerta a causa del seu triple enllaç entre els àtoms de nitrogen. Tot i que es calcula que entre 2 i $10 \cdot 10^9$ kg/any es fixat degut a les descarregues elèctriques produïdes pels llamps, la major part d'aquest procés es dut a terme per bacteris i arqueobacteris coneguts com a diazòtrofs. Aquest microorganismes disposen de l'enzim nitrogenasa, capaç de combinar el nitrogen gasos amb hidrogen per a forma amoníac/amoni (NH_3/NH_4^+), el qual es aprofitat pel propi bacteri per a produir altres components orgànics.

Degut a les propietats oxidatives de l'oxigen, la majoria de les nitrogenases són inhibides de manera irreversible per la molècula d'oxigen (O_2), la qual oxida els cofactors de Fe i S, degradant-los. Això requereix mecanismes pels fixadors de nitrogen per tal d'evitar l'oxigen. Exemple d'això es la relació simbiòtica establerta entre bacteries fixadores de nitrogen, com el gènere *Rhizobium* que viu als nòduls de les arrels de plantes lleguminoses. D'aquesta manera, els bacteris produeixen l'amoníac que la planta necessita i aquesta li permet capturar els carbohidrats produïts. Degut a aquesta relació, les plantes lleguminoses tenen la capacitat d'enriquir sols pobres en nitrogen.

2. Nitrificació

La nitrificació es un procés oxidatiu de 2 etapes on el amoni i l'amoníac (NH_3 i NH_4^+) es convertit en nitrats (NO_3^-), que poden ser absorbits per les arrels de les plantes. Es tracta La primera etapa ($NH_3/ NH_4^+ \rightarrow NO_2^-$) es duta a terme per bacteris nitrificadors, com les del gènere *Nitrosomonas*. Mentre que la segona etapa ($NO_2^- \rightarrow NO_3^-$) es duta a terme per bacteries del gènere *Nitrobacter*.

Ambdós tipus de bacteries obtenir la seva energia a partir de la oxidació d'aquestes compostes nitrogenats inorgànics.



3. Assimilació

L'assimilació es el procés pel qual les plantes i els animals incorporen NO_3^- i NH_4^+ format gracies a la fixació del nitrogen i a la nitrificació.

Les plantes poden absorbir el nitrat o l'amoní del sol per mitja de les seves arrels. Quant el nitrat es absorbit, es reduït a nitrit (NO_2^-) i posteriorment a amoni (NH_4^+) per a poder ser incorporat als aminoàcids, àcids nucleics o clorofil·la. Les plantes que tenen una relació simbiòtica amb el gènere *Rhizobium*, poden assimilar l'amoní de forma directa a traves dels seus nòduls a les arrels.

La resta d'animals, fongs o organismes heterotròfics obtenen el seu nitrogen per mitja de la ingestió d'aminoàcids, nucleòtids o altres molècules orgàniques petites.

4. Amonificació

L'amonificació es la conversió del nitrogen orgànic en amoníac (NH_3) o amoni (NH_4^+). Aquest procés produeix grans quantitats de nitrogen, degut a la degradació de proteïnes, aminoàcids i àcids nucleics. D' aquesta manera, el nitrogen produït en forma d'amoní esta disponible en el medi per a la seva nitrificació o assimilació.

5. Desnitrificació

La desnitrificació es la reducció del nitrats en gas nitrogen (N_2), completant el cicle del nitrogen. Aquest procés es dut a terme per bacteries del genera *Pseudomonas* i *Clostridium*, en condicions anaeròbiques. Aquestes bacteries utilitzen el nitrat com a acceptor de electrons en lloc de l'oxigen durant la respiració. Com a conseqüència, es produeix gas nitrogen, el qual torna a l'atmosfera.

El pH òptim per la desnitrificació es de 7-8, donat que quan $\text{pH} > 6$ l'enzim òxid nitrós reductasa queda inhibit.

6. Annamox

La reacció annamox (Oxidació anaeròbica d'amoni, *Anaerobic ammonium oxidation*) es un dels dos processos capaços d'alliberar nitrogen a l'atmosfera (l'altre es la desnitrificació). S'estima que l'annamox es responsable del 50% de la producció de dinitrogen en ambients marins.

Aquesta reacció comporta la conversió de nitrit (NO_2^-) i amoni (NH_4^+) a gas nitrogen (N_2) i es duta terme per un gènere que ha estat recentment descobert anomenat *Brocadia*. Per tal de poder dur a terme aquesta funció, aquest tipus de bacteris disposen d'un endosoma on emmagatzemar productes com tòxics com la hidroxilamina i compostos hidrazinics.

7. Eutrofització

L'eutrofització es defineix com l'enriquiment de l'aigua per nutrients, especialment compostos amb nitrogen i fòsfor. Aquests compostos provoquen un creixement accelerat d'algues i de vegetals superiors que produeix un efecte indesitjable en el funcionament de l'ecosistema i en la qualitat de l'aigua afectada. Al final, tot plegat afecta negativament la producció de béns i serveis per a les persones.

Aquest procés pot ser d'origen natural (acumulació d'aigües i matèria en descomposició) o bé d'origen humà (abocament residus).

Per a quantificar l'eutrofització de les aigües s'utilitzen indicadors biològics i fisico-químics, com per exemple la concentració de clorofil·la-a (mesura indirecta per la concentració d'algues) o els nutrients inorgànics dissolts. Aquestes dades son utilitzades per avaluar l'estat tròfic d'un sistema i classificar-lo en categories: oligotròfic (concentracions baixes de nutrients), mesotròfic (concentracions mitges de nutrients) o eutròfic (concentracions altes de nutrients).

En la següent taula, es pot veure com interaccionen (augment/disminució) els components esmentats juntament amb altres compostos que es troben en el medi.

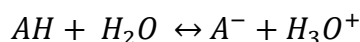
Procés		Produeix						
		pH	O ₂	NH ₄ ⁺	NO ₂ ⁻	NO ₃ ⁻	PO ₄ ⁻	CO ₂
Nitrificació	$\text{NH}_3/\text{NH}_4^+ \rightarrow \text{NO}_2^- \rightarrow \text{NO}_3^-$	▼	▼	▼	▲	▲	-	-
Assimilació	Captura de NH_4^+ y NO_3^- per plantes	▲	▲	▼	-	▼	▼	▼
Amonificació	Nitrogen orgànic convertit a $\text{NH}_3/\text{NH}_4^+$	▲	-	▲	-	▼	-	-
Desnitrificació	Reducció nitrats a $\text{N}_{2(g)}$	-	-	-	▼	▼	-	-
Eutrofització	Descomposició matèria orgànica	▼	▼	▲	-	-	▲	▲

4. EQUACIÓ HENDERSON-HASSELBALCH

L'equació Henderson-Hasselbalch descriu la relació entre el pH i la constant de dissociació d'un àcid o base (pK_A o pK_B , respectivament) utilitzant el pH com a mesura d'acidesa en un sistema biològic. Aquesta equació sol ser emparada en la preparació de solucions amortidores (buffer).

La transferència de protons es un aspecte fonamental en processos químics i biològics. Per tant, la comprensió de les causes termodinàmiques, i predicció de les seves conseqüències, es de vital importància en moltes àrees de la química i la bioquímica.

Donada la següent reacció,



L'equació Henderson-Hasselbalch defineix que

$$pH = pK_A + \log_{10} \left(\frac{[A^-]}{[AH]} \right), \text{ on } pK_A = -\log_{10}(K_A)$$

$$\text{ o } pH = pK_A + \log_{10} \left(\frac{\alpha}{(1 - \alpha)} \right)$$

D'on podem aïllar α ($[A^-]$) i calcular a partir de la pK_A i el pH, tal que: $\alpha = \frac{1}{(10^{pK_A - pH} + 1)}$

Per altre banda, l'equació de Gibbs defineix que $\Delta G = -RT * \ln(K_{eq})$, on la constant d'equilibri K_{eq} equival a la K_A ¹, podem aïllar pK_A , de la següent manera:

$$\Delta G = -RT * \ln(10) * pK_A$$

$$pK_A = \frac{\Delta G}{\ln(10) * RT}$$

La dissociació d'àcids/bases depèn del pH i la temperatura del medi en que es dona la reacció. Tant mateix, el pK_A es directament proporcional a l'energia lliure de Gibbs (ΔG), donat que la constant de dissociació (K_A) equival a la constant d'equilibri (K_{eq}) en l'equació de Gibbs.

Per exemple, si ΔH es positiu ($\Delta G > 0$, dissociació endotèrmica), pK_A disminueix comportant un augment de la K_A , la qual cosa implica que la reacció afavoreix la dissociació quan la temperatura s'incrementa. Aquesta dissociació comporta un increment en la concentració de protons al medi ($[H^+]$) i, conseqüentment, disminueix el pH del medi. Si la dissociació es exotèrmica, s'observarà l'efecte oposat.

Procés	pH	K_A	pK_A
Dissociació endotèrmica ($\Delta G > 0$)	▲	▲	▼
Dissociació exotèrmica ($\Delta G < 0$)	▼	▼	▲

¹ En condicions ideals i simplificant ($\Delta G^\circ = 0$)

Recordem que:

- Un procés serà espontani ($\Delta G < 0$) si $\Delta H < 0$ i $\Delta S > 0$
- Un procés no serà espontani ($\Delta G > 0$) si $\Delta H > 0$ i $\Delta S < 0$
- Un procés pot ser espontani ($\Delta G < 0$) si
 - $\Delta H < 0$ i $\Delta S < 0$ o $\Delta H > 0$ i $\Delta S > 0$, en funció de la temperatura ($-T\Delta S$)
- La capacitat amortidora d'una solució, es major quan $\text{pH} = \text{pKa}$.
- Quan el $\text{pH} = \text{pKa}$, el logaritme de la relació de les concentracions de las formes dissociada (A^-) i sense dissociar (HA) serà zero, de tal manera que $[\text{A}^-] = [\text{HA}]$. Dit d'un altre manera, quan el $\text{pH} = \text{pKa}$, l'àcid estarà dissociat al 50%.
- Quan el pH augmenta/disminueix 1 unitat en relació a la pKa , la relació entre la forma dissociada ($[\text{A}^-]$) i no dissociada ($[\text{HA}]$) canvia en un factor de 10. Es a dir, si el pH d'una dissolució es 6 y el pKa es 7, la relació $[\text{A}^-]/[\text{HA}]$ serà 0,1.

	$\Delta H > 0$ (Reacció endotèrmica)	$\Delta H < 0$ (Reacció exotèrmica)
$\Delta S > 0$ (Augment entropia)	$\Delta G < 0$ quan \uparrow temperatura $\Delta G > 0$ quan \downarrow temperatura (Procés <i>espontani</i> a temperatures elevades)	$\Delta G < 0$ a qualsevol temperatura (Procés <i>espontani</i> a qualsevol temperatures)
$\Delta S < 0$ (Reducció entropia)	$\Delta G > 0$ a qualsevol temperatura (Procés <i>no espontani</i> a qualsevol temperatures)	$\Delta G < 0$ quan \uparrow temperatura $\Delta G > 0$ quan \downarrow temperatura (Procés <i>espontani</i> a temperatures baixes)

5. ESTADÍSTICA

A continuació cal fer un tractament de les dades per tal d'avaluar.net la fiabilitat, en termes d'exactitud i precisió. L'exactitud esta determinada per la diferencia numèrica entra la mitja d'una sèrie de mesures repetires i el valor vertader. La precisió es la desviació estàndard o el coeficient de variació d'un grup de mesures repetides. Així, s'ha de calcular:

La mitjana (\bar{X}) dels factors de correcció determinats experimentalment (X_i):

$$\bar{X} = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N X_i$$

La desviació estàndard (σ):

$$\sigma = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N (X_i - \bar{X})^2}{N - 1}}$$

La variància (σ^2)

El tant per cent del coeficient de variació (%CV), es un paràmetre que avalua la precisió de les mesures:

$$\%CV = \frac{\sigma}{\bar{X}} \times 100$$

El criteri imposat per avaluar les límits de confiabilitat de la mitjana es $\bar{X} \pm 2\sigma$ (aquest valors no s'han de sumar, la dada s'expressa posant la mitja \pm el doble de la desviació estàndard)

6. EQUIP COLORIMETRIA

	Peak wavelength	Dominant wavelength	Intensity	Spectral bandwidth
Red Light	632 nm	625 nm	1077.5 mcd	18 nm
Green Light	523 nm	528 nm	1570 mcd	33 nm
Blue Light	465 nm	470 nm	377.5 mcd	25 nm

7. RECTES PATRÓ

6.1. COLORANTS ALIMENTARIS

Els colorants alimentaris son productes fàcils d'adquirir en supermercats o tendes especialitzades de rebosteria o química. Son productes àmpliament utilitzats en un gran nombre de productes de consum.

	Eritrosina B	Erioglaucina	Sunset Yellow
Nom comercial	<i>Acid Red #51</i>	<i>Blue #1</i>	<i>Food Yellow #3</i>
Sigma Catàleg #	198269-25G	861146-25G	465224-25G
λ_{\max} (nm)	522	628	482
Pes molecular (g/mol)	879.86	792.85	452.37
Coef. Extinció Molar (L/Mol*cm)	$\geq 82,500$ (524-528 nm)	$\geq 80,000$ (627-637 nm)	$\geq 20,000$ (479-485 nm)

Protocol

1. Prepara dilucions Stock A 1 mM.

	H ₂ O (mL)	Massa (g)
Eritrosina B	250	0,220
Erioglaucina	250	0,198
Sunset Yellow	250	0,113

2. Prepara les dilucions de treball (Stock B).

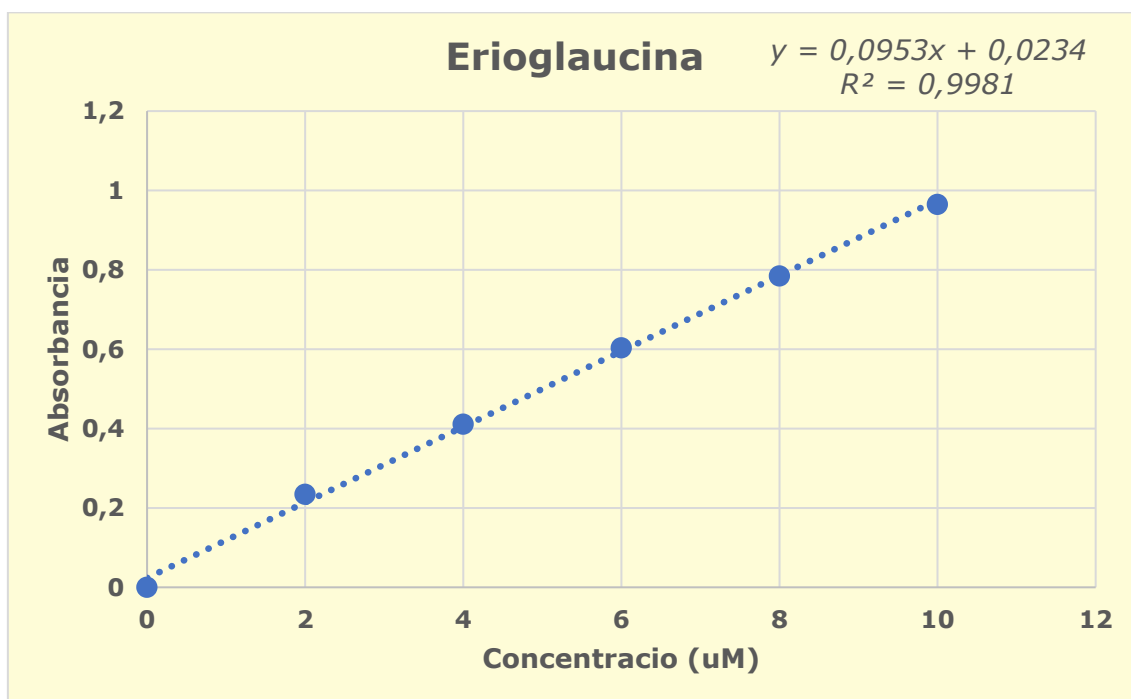
	Stock A 1mM (mL)	H ₂ O (mL)	Stock B (μ M)	Longitud d'ona (λ)
Eritrosina B	1	250	4	528 nm
Erioglaucina	2,5	250	10	625 nm
Sunset Yellow	10	250	40	470 nm

3. Prepara la recta patró

Tub	Stock B μ M (mL)	H ₂ O (mL)	Concentració (μ M)		
			Eritrosina B	Erioglaucina	Sunset Yellow
0	0	5	0	0	0
1	1	4	0,8	2	8
2	2	3	1,6	4	16
3	3	2	2,4	6	24
4	4	1	3,2	8	32
5	5	0	4	10	40

4. Mitjançant el colorímetre, realitza les mesures pertinents.

$Massa (g) = Concentració (mol/L) * Volum (L) * Pes Molecular (g/mol)$
 $Concentració Inicial * Volum Inicial = Concentració Final * Volum Final$
 Verd/528 nm ; Vermell/625 nm ; Blau/470 nm



Concentració (uM)	Absorbància (σ)	Desviació estàndard (σ)	X ₁	X ₂	X ₃
0	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
2	0,234	0,004	0,230	0,235	0,238
4	0,411	0,003	0,410	0,408	0,415
6	0,604	0,006	0,598	0,610	0,603
8	0,785	0,004	0,780	0,785	0,789
10	0,965	0,005	0,970	0,960	0,965

6.2. DETERMINACIÓ NITRATS

6.2.1. Amoníac/Amoni ($\text{NH}_3/\text{NH}_4^+$)

A) Assaig amb kit comercial

Reactius i equipament

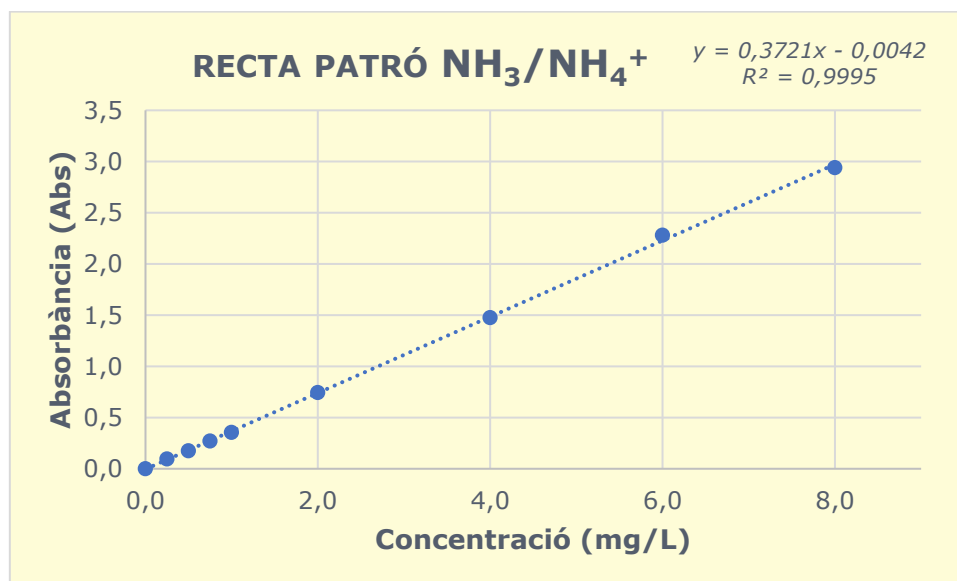
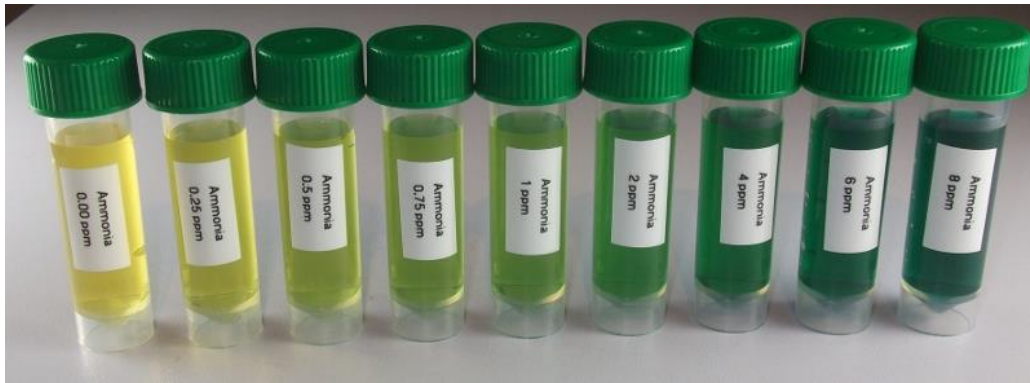
- Estàndard amoni, 1000 mg/L NH_4^+ en aigua (Sigma, 59755-100ML)
- API Fishcare Ammonia ($\text{NH}_3/\text{NH}_4^+$) Test Kit, LR8600
- Aigua desionitzada
- Proveta 100 ml
- Matràs aforat 100 ml
- Aspirador pipetes
- Pipetes graduades (0.25, 1.0 i 2.0 ml)
- Tubs 10 ml
- Cubetes espectrofotometria plàstic

Protocol

1. Diluir la solució estàndard d'amoniàc de 1.000 mg/L NH_4^+ amb aigua desionitzada per obtenir una estoc de treball de 100 mg/L.
2. Utilitzant els matrassos aforats de 100 ml, diluir l'estoc de treball tal com s'indica a la taula següent:

Tub	Amoníac (mg/L)	$\text{NH}_3/\text{NH}_4^+$ 100 mg/L (ml)	Aigua desionitzada (ml)
1	0.00	0.00	100.00
2	0.25	0.25	99.75
3	0.50	0.50	99.50
4	0.75	0.75	99.25
5	1.00	1.00	99.00
6	2.00	2.00	98.00
7	4.00	4.00	96.00
8	6.00	6.00	94.00
9	8.00	8.00	92.00

3. Transfereix 5 ml de cada solució de calibratge a un tub d'assaig de 5 ml.
4. Afegir 8 gotes d'API Ammonia Test Solution, Bottle # 1 a cada tub. Tancar el tub i invertir per a homogeneïtzar la dissolució.
5. Afegir 8 gotes d'API Ammonia Test Solution, Bottle # 2 a cada tub. Tancar el tub i invertir per a homogeneïtzar la dissolució.
6. Incubar 5 minuts a temperatura ambient.
7. Transferir 1 ml de cada tub a una cubeta.
8. Mesurar amb el LED vermell.



B) Mètode de l'àcid salicílic

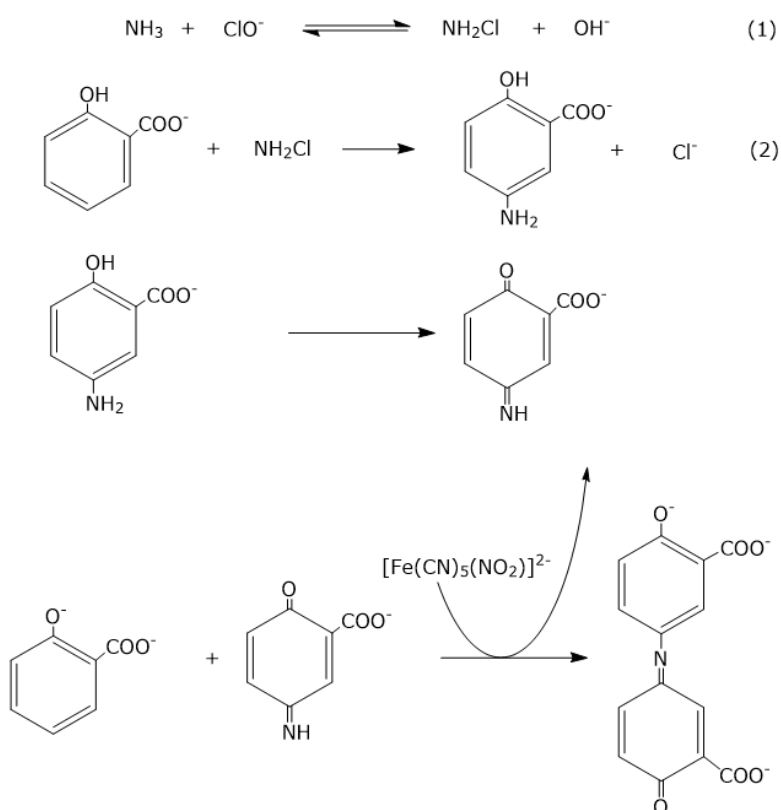
El mètode es basa en l'ús de l'àcid salicílic per a la determinació del nitrogen present en la mostra. En aquest sentit, es necessari gener un producte intermediari a partir de l'amoniac que pugui reaccionar amb l'àcid salicílic i que, mitjançant un catalitzador, donarà lloc a un complex de color blau. Aquest color quedarà emmascarat per un excés de nitroprusi (color groc), donant lloc a una dissolució de color verd.

Els resultats s'expressen en ppm (mg/L) d'amoniac-nitrogen, $\text{NH}_3\text{-N}$.

El mètode del salicilat ofereix una sensibilitat similar al mètode Nesslerització, però amb l'avantatge de no generar residus amb mercuri.

El mètode es basa en 2 reaccions:

- 1) L'amoniac (NH_3) reacciona amb l'hipoclorit (ClO^-) per formar monoclорamina (NH_2Cl).
- 2) La monoclорamina reacciona amb l'àcid salicílic per formar àcid 5-aminosalicílic².



L'oxidació del 5-aminosalicilat es realitza en presència d'un catalitzador, nitroprusi ($\text{Fe}(\text{CN})_5\text{NO}_2$, també anomenat nitroferriicianida). L'indosalicilat resultant, es un compost de color blau anomenat 5-aminosalicílic. El color blau queda emmascarat per un excés de nitroprusi (color groc), donant lloc a una solució de color verd. La intensitat d'aquest verd es directament proporcional a la concentració d'amoniac de la mostra.-

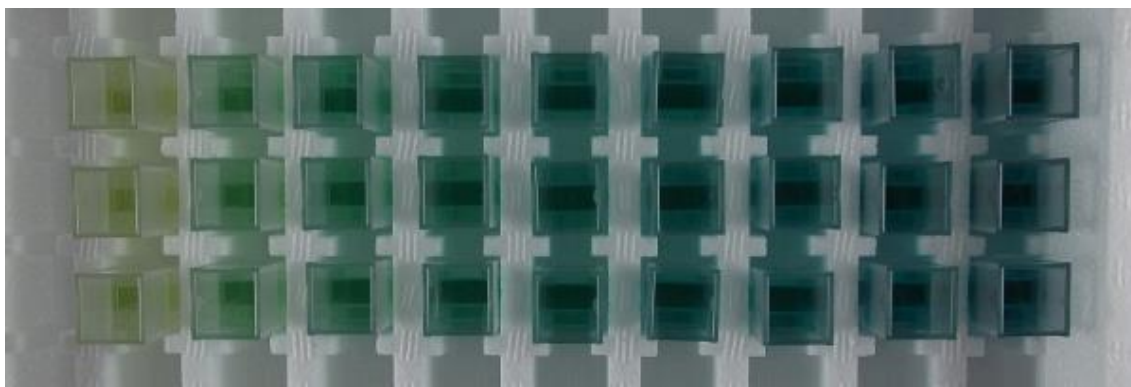
² Mesalazina (àcid 5-aminosalicílic) <https://ca.wikipedia.org/wiki/Mesalazina>

Reactius i equipament

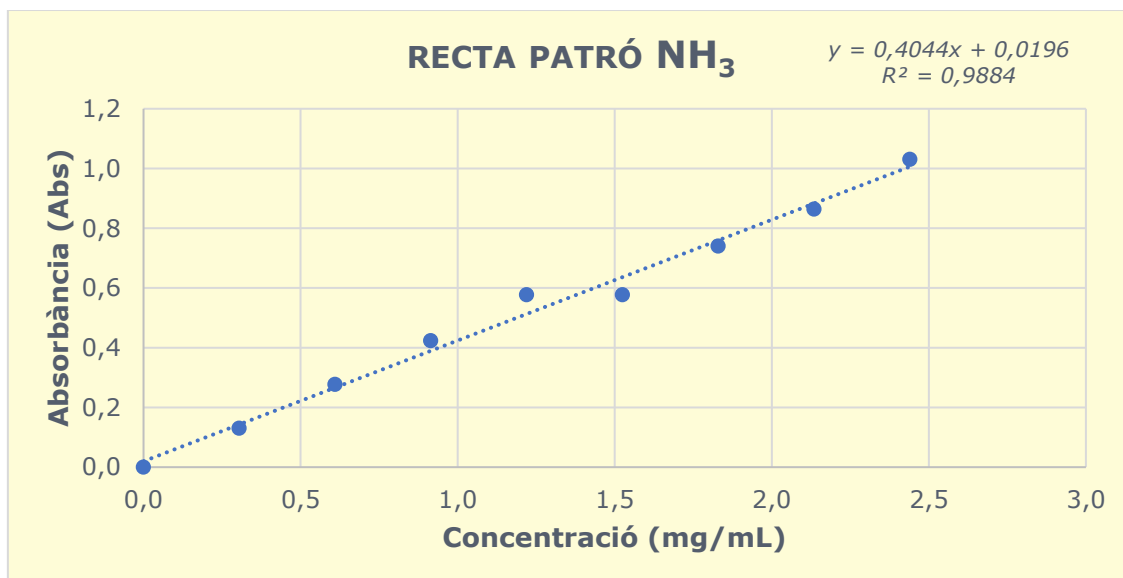
- Hidròxid de sodi (Sigma, S5881-500G-D)
- Hipoclorit de sodi 6% (lleixiu comercial)
- Salicilat de sodi (Sigma, S2679-100G)
- Nitroprussiat sòdic (Sigma, 228710-5G)
- Aigua desionitzada³
- Proveta 100 ml
- Matràs aforat 100 ml
- Aspirador pipetes
- Pipetes graduades (0.25, 1.0 i 2.0 ml)
- Tubs assaig
- Cubetes espectrofotometria de plàstic

Protocol

1. Preparar la solució d'hipoclorit
 - Omplir un matràs aforat amb 70ml d'aigua desionitzada
 - Afegir 1ml de lleixiu 6%
 - Afegir 0.5g de NaOH i barrejar fins que es dissolgui.
 - Omplir el matràs aforat fins a un volum final de 100ml.
2. Prepara la solució d'àcid salicílic
 - Omplir un matràs aforat amb 70ml d'aigua desionitzada
 - Afegir 10g de salicilat de sodi
 - Afegir 0.05g de nitroprussiat sòdic i barrejar fins que es dissolgui.
 - Ajustar el pH 12.0
 - Omplir el matràs aforat fins a un volum final de 100ml.
 - Mantenir la dissolució en una zona fosca
3. Assaig colorimètric
 - Transferir un 1ml de cada mostra d'aigua en una cubeta diferent
 - Afegir 0.25ml de la solució d'hipoclorit i barrejar per inversió.
 - Afegir 0.25ml de la solució d'àcid salicílic i barrejar per inversió.
 - Incubar a temperatura ambient durant 10 minuts i en una zona sense llum
 - Analitzar les mostres en el colorímetre.



³ Es recomana l'ús d'aigua desionitzada en comptes d'aigua destil·lada, donat que la destil·lació no elimina les traces de substàncies que contenen nitrogen, alterant així el resultat. Pot utilitzar-se aigua destil·lada, però cal ser conscient d'aquest fet alhora d'interpretar els resultats.



6.2.2. Nitrat [NO₃⁻]

A) Assaig amb kit de comercial

Reactius i equipament

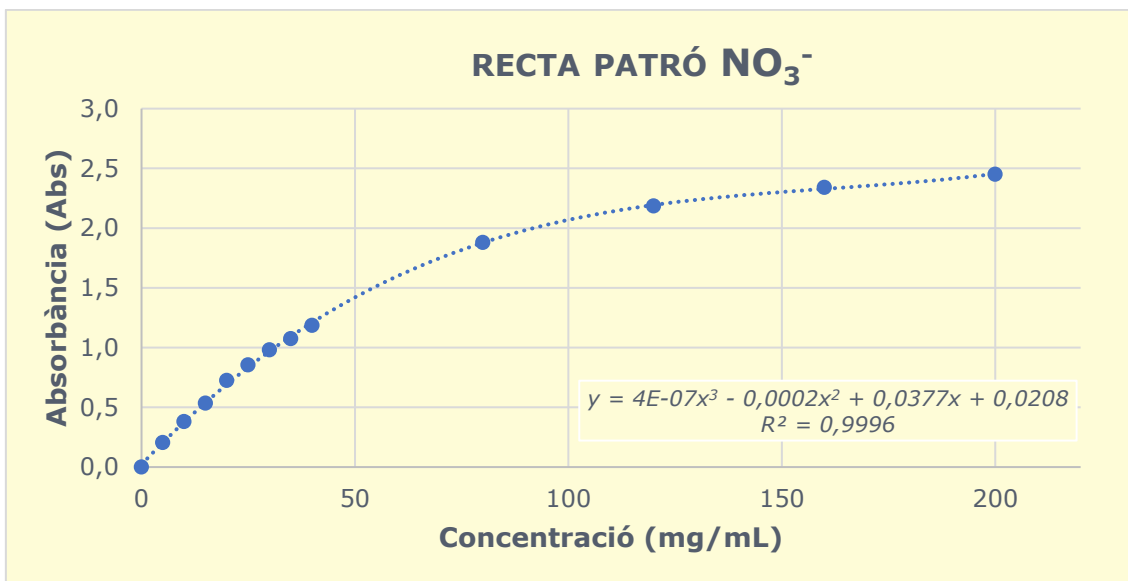
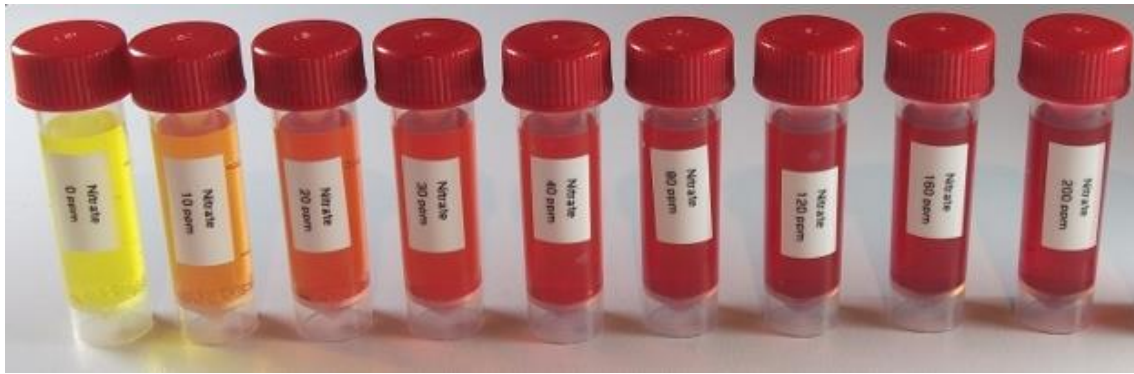
- Estàndard nitrat, 1000 mg/L NO₃⁻ en aigua (Sigma, 74246-100ML)
- API Fishcare Nitrate Test Kit, LR1800
- Aigua desionitzada
- Proveta 100 ml
- Matràs aforat 100 ml
- Aspirador pipetes
- Pipetes graduades (0.25, 1.0 i 2.0 ml)
- Tubs assaig
- Cubetes espectrofotometria plàstic

Protocol

1. Utilitzant els matrassos aforats de 100 ml, diluir l'estoc de treball tal com s'indica a la taula següent segons les necessitats:

Tub	Nitrat (mg/L)	Nitrat 200 mg/L (ml)	Aigua desionitzada (ml)
1	0	0,000	5,000
2	5	0,125	4,875
3	10	0,250	4,750
4	15	0,375	4,625
5	20	0,500	4,500
6	25	0,625	4,375
7	30	0,750	4,250
8	35	0,875	4,125
9	40	1,000	4,000
10	80	2,000	3,000
11	120	3,000	2,000
12	160	4,000	1,000
13	200	5,000	0,000

2. Transfereix 5 ml de cada solució de calibratge a un tub d'assaig de 5 ml.
3. Afegir 10 gotes d'API Nitrate Test Solution, Bottle # 1 a cada tub. Tancar el tub i agitar vigorosament 60 segons.
4. Afegir 10 gotes d'API Nitrate Test Solution, Bottle # 2 a cada tub. Tancar el tub i invertir per a homogeneïtzar la dissolució.
5. Incubar 5 minuts a temperatura ambient.
6. Transferir 1ml de cada tub a una cubeta.
7. Mesurar amb el LED verd.

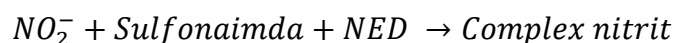


B) Mètode enzimàtic nitrat reductasa

Aquest mètode enzimàtic va ser publicat a l'any 2014 (*Method for Nitrate Reductase Nitrate-Nitrogen Analysis. 2014, NECi Method N07-0003*). Es tracta d'una variació del mètode de Greiss (veure Determinació NO_2^-), però amb una sensibilitat 100 vegades major. Es un mètode basat en l'ús d'enzims com a alternativa al mètode tradicional basat en la reducció de cadmi i que, per tant, no es tòxic per al medi ambient.

El protocol emparat per quantificar la suma de nitrits i nitrats d'una mostra, però pot emparar-se per quantificar només un dels dos ions.

Activitat enzimàtica: 1 unitat enzimàtica redueix 1.0 NO_3^- mM/min en presència de β -NADPH a pH 7.5, 25 °C.



Abreviacions:

β -NADH = β -Nicotinamide Adenine Dinucleotide, forma reduïda

β -NAD = β -Nicotinamide Adenine Dinucleotide, forma oxidada

NED = *N*-(1-Naphthyl)ethylenediamine Dihydrochloride



Reactius i equipament

- Fosfat de potassi KH_2PO_4 (Sigma, P5655-100G)
- Hidròxid de potassi (Sigma, 221473-500G-M)
- EDTA 0.5M pH8.0 (Sigma, 03690-100ML)
- β -NADH (Sigma, N8129-50MG)
- Nitrate Reductasa ≥ 300 unitats/g (Sigma, N7265-2UN)
- Sulfanilamida (Sigma, S9251-100G)
- HCl 3M
- NED (Sigma, 222488-5G)
- Aigua desionitzada⁴
- Proveta 100 ml
- Matràs aforat 100 ml
- Ampolla opaca (20ml mínim)
- Aspirador pipetes
- Pipetes graduades (0.25, 1.0 i 2.0 ml)
- Tubs assaig
- Cubetes espectrofotometria de plàstic

⁴ Es recomana l'ús d'aigua desionitzada en comptes d'aigua destil·lada, donat que la destil·lació no elimina les traces de substàncies que contenen nitrogen, alterant així els resultats. Pot utilitzar-se aigua destil·lada, però cal ser conscient d'aquest fet alhora d'interpretar els resultats.

Recta patró

Tub	Nitrat (mg/mL)	Nitrat 100 mg/mL (mL)	Aigua desionitzada (mL)
1	0	0,00	5,00
2	5	0,25	4,75
3	10	0,50	4,50
4	15	0,75	4,25
5	20	1,00	4,00
6	25	1,25	3,75
7	30	1,50	3,50
8	35	1,75	3,25
9	45	2,25	2,75

Protocol

1. Preparació de les solucions

- A) Buffer fosfat (25 mM KH_2PO_4 + 10 mM KOH + 0.025 mM EDTA), pH 7.5)
Dissoldre 0.5ml EDTA 0.5M en 20ml d'aigua desionitzada i reservar.
Dissoldre 3.45g de KH_2PO_4 i 1.40.57g de KOH d'hidròxid de potassi en 900ml d'aigua desionitzada.
Afegir 1 mL d'EDTA 25 mM.
Ajustar el pH a 7.5.
Enrasar a 1000 mL amb aigua desionitzada.
- B) B-NADH (2.0 mM)
Dissoldre 0.15g de b-NADH en 100 mL d'aigua desionitzada.
Alíquotar segons necessitats. Aquesta dissolució pot emmagatzemar-se al congelador fins al seu moment d'ús.
- C) Nitrat reductasa (2U/ml)
Preparar just abans de fer servir, utilitzant aigua desionitzada freda i mantenir a les fosques fins a la seva utilització.
Dissoldre Xg de Nitrat Reductasa en X mL d'aigua desionitzada.
Mantenir en fred.
- D) Sulfonamida (58mM)
Preparar 20 ml solució 3M HCl i reservar.
En una ampolla opaca, afegir 0.15g de sulfonamida. Afegir 15ml de HCl 3M a l'ampolla amb la sulfonamida.
Tancar l'ampolla i agitar suaument fins a dissoldre la sulfonamida.
- E) NED (0.77mM)
Pesar 0.02g de NED en una ampolla opaca
Afegir 100mL d'aigua desionitzada
Tancar l'ampolla i agitar fins dissoldre.

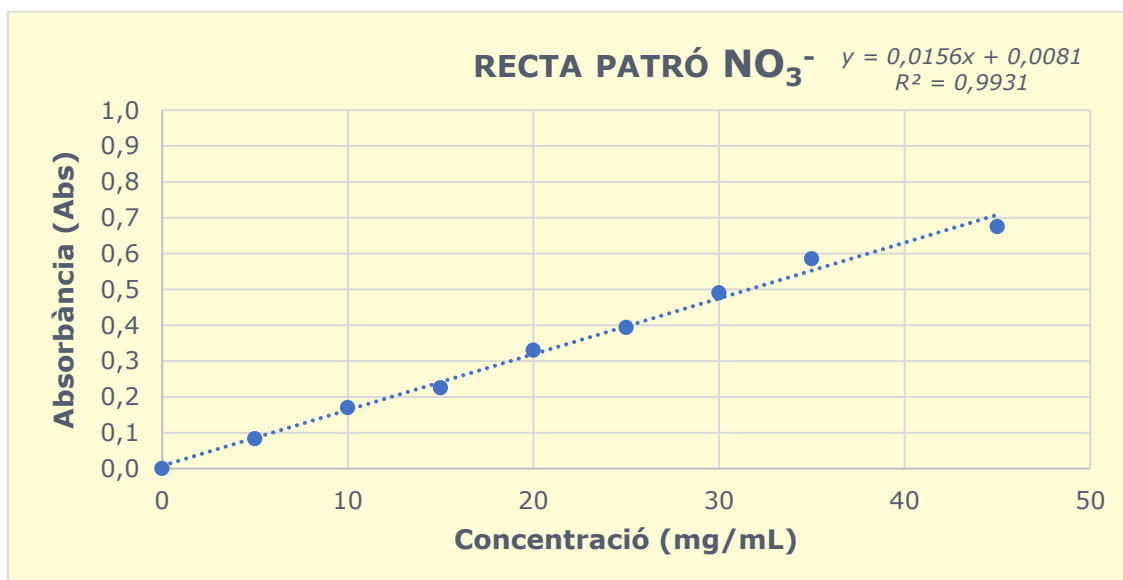
2. Preparar la *master mix* de l'assaig enzimàtic

	Reactiu	1X Mix	10X Mix
A	Buffer fosfat	890 uL	8.9 mL
B	b-NADH	100 uL	1.0 mL
C	Nitrat reductasa	10 uL	0.1 mL
	Volum final	1000 uL	10.0 mL

Mantenir la *master mix* en fred fins a la seva utilització.

3. Assaig colorimètric

Transferir 1 mL de la master mix a un tub nou
 Afegir 50uL de la mostra d'aigua i barrejar vigorosament
 Incubar a temperatura ambient durant 20 minuts
 Afegir 0.5mL de la solució D (sulfonamida, 58mM) a la barreja
 Afegir 0.5 mL de la solució E (NED, 0.77mM)
 Transferir 1.5mL a la cubeta de lectura
 Llegir la mostra amb l'equip.



6.2.3. Nitrit [NO₂-]

A) Assaig amb kit de comercial

Reactius i equipament

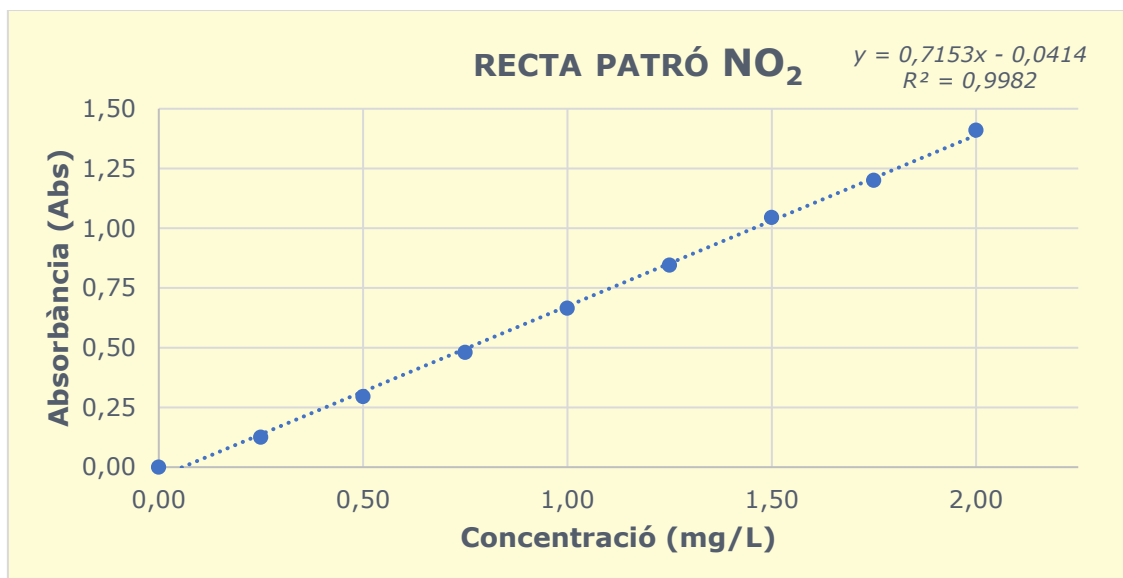
- Nitrite Standard for IC 1000mg/mL (Sigma, 67276-100ML)
- API Fishcare Nitrite Test Kit
- Aigua desionitzada
- Proveta 100 ml
- Matràs aforat 100 ml
- Aspirador pipetes
- Pipetes graduades (0.25, 1.0 i 2.0 ml)
- Tubs assaig
- Cubetes espectrofotometria plàstic

Protocol

8. Diluir l'estàndard de nitrit 1,000 ppm amb aigua desionitzada a una concentració final de 100 ppm.
9. Utilitzant els matrassos aforats de 100 ml, diluir l'estoc de treball tal com s'indica a la taula següent segons les necessitats:

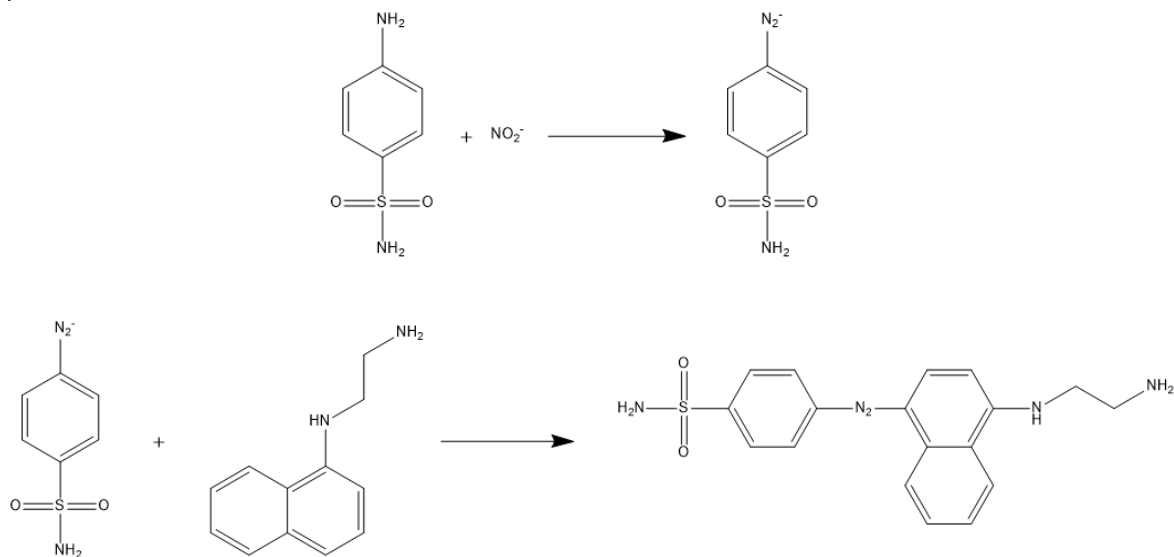
Tub	Nitrat (ppm)	Nitrat 100 ppm (ml)	Aigua desionitzada (ml)
1	0,00	0,00	100,00
2	0,25	0,25	99,75
3	0,50	0,50	99,50
4	0,75	0,75	99,25
5	1,00	1,00	99,00
6	1,25	1,25	98,75
7	1,50	1,50	98,50
8	1,75	1,75	98,25
9	2,00	2,00	98,00

10. Transfereix 5 ml de cada solució de calibratge a un tub d'assaig de 5 ml.
11. Afegir 5 gotes d'API Nitrite Test Solution, Bottle # 1 a cada tub. Tancar el tub i agitar vigorosament.
12. Incubar a temperatura ambient durant 5 minuts.
13. Transferir 1ml de cada tub a una cubeta.
14. Mesurar amb el LED verd.



B) Mètode de Griess

El mètode Griess es un assaig químic que detecta la presència de nitrits (NO_2^-). Aquest mètode es basa en l'ús de diferents compostos que, en combinar-se, donen lloc a un complex de color vermell. La formació d'aquest complex es directament proporcional a la quantitat de nitrits presents en la mostra.



Reactius

- Nitrite Standard for IC 1000mg/mL (Sigma, 67276-100ML)
- Sulfanilamida (Sigma, S9251-100G)
- HCl 3M
- NED (Sigma, 222488-5G)
- Aigua desionitzada⁵
- Proveta 100 ml
- Matràs aforat 100 ml
- Ampolla opaca (20ml mínim)
- Aspirador pipetes
- Pipetes graduades (0.25, 1.0 i 2.0 ml)
- Tubs assaig
- Cubetes espectrofotometria de plàstic

Mètode

1. Preparació de les dissolucions

A) Nitrit 100mg/L

Afegir 90ml d'aigua desionitzada en una proveta de 100ml
Afegir 10ml de Nitrite Standard for IC.
Barrejar i reservar.

B) Sulfonamida 1%

Preparar 15 ml solució 3M HCl i reservar.
En una ampolla opaca, afegir 0.15g de sulfonamida. Afegir 15ml de HCl 3M a l'ampolla amb la sulfonamida.
Tancar l'ampolla i agitar suaument fins a dissoldre la sulfonamida.

⁵ Es recomana l'ús d'aigua desionitzada en comptes d'aigua destil·lada, donat que la destil·lació no elimina les traces de substàncies que contenen nitrogen, alterant així el resultat. Pot utilitzar-se aigua destil·lada, però cal ser conscient d'aquest fet alhora d'interpretar els resultats.

C) **NED 0.02%**

Pesar 0.02g de NED en una ampolla opaca

Afegir 100mL d'aigua desionitzada

Tancar l'ampolla i agitar fins dissoldre.

2. Assaig colorimètric

Transferir 1 mL de cada mostra en un tub independent

Afegir 50 µL de la solució A i homogeneïtzar la solució per inversió.

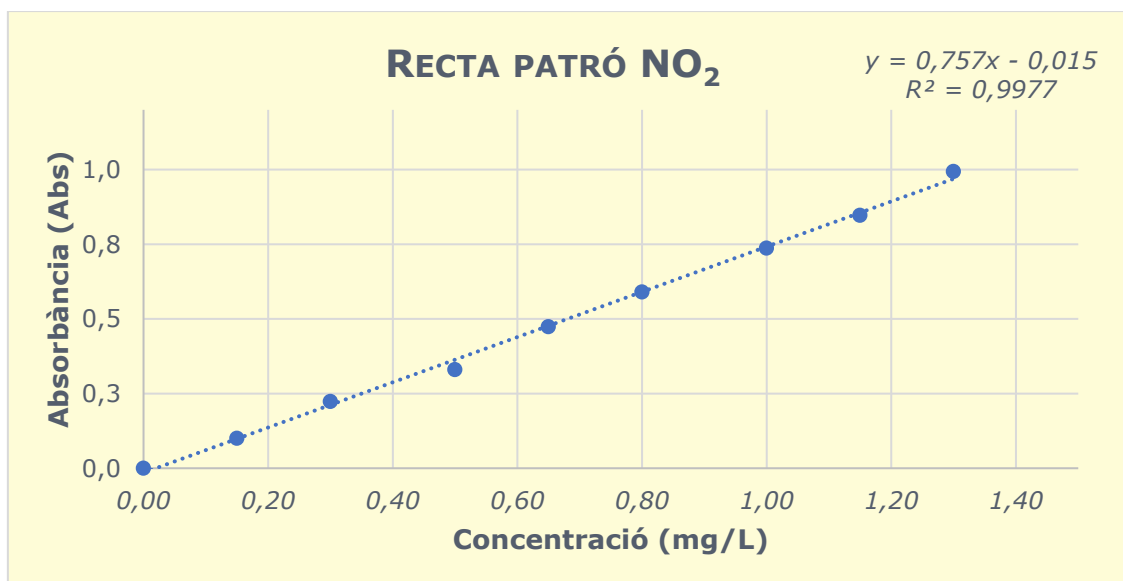
Afegir 50 µL de la solució B i homogeneïtzar la solució per inversió.

Incubar a temperatura ambient durant 10 minuts

Transferir 1.5mL a la cubeta de lectura

Llegir la mostra amb el colorímetre (VERD).

Tub	Nitrit (mg/mL)	100 mg/L stock (mL)	Aigua desionitzada (mL)
1	0,00	0,00	100,00
2	0,15	0,15	99,85
3	0,30	0,30	99,55
4	0,50	0,50	99,05
5	0,65	0,65	98,40
6	0,80	0,80	97,60
7	1,00	1,00	96,60
8	1,15	1,15	95,45
9	1,30	1,30	94,15



8. DISCUSSIÓ

7.1. CONCEPTES

- Propietats ones electromagnètiques
 - o Dualitat ona-partícula
 - Fotons, energia
 - Interacció amb la matèria
 - o Característiques ona electromagnètica (amplitud, freqüència, longitud d'ona)
- Tipus d'ones electromagnètiques
 - o Utilització en comunicacions, medicina, etc...
 - o Impacte en la salut humana
- Espectre visible
 - o Longitud d'ona (espectre visible, opacitat dels materials)
- Llei Lambert-Beer
 - o Absorbància: relació absorbància – concentració
 - o Possibles alternatives tecnològiques i aplicacions
- Dissolucions
 - o Procediments i càlculs
 - Dissolucions bàsiques
 - Dissolucions seriades
 - o Rectes patró
 - Graficació
 - Determinació analítica de les mostres
 - Regressió lineal
 - Anàlisi estadístic de les dades
- Cicle del Nitrogen
 - o Fixació del nitrogen
 - Microorganismes implicats
 - Relació simbiòtica bacteris nitrificadors - plantes
 - o Relació entre els diferents elements
 - Retroalimentació positiva dins l'ecosistema
 - Variables ambientals alteració cicle (temperatura, pH, oxigen, etc...)

7.2. ACTIVITATS

La següent activitat proposa l'estudi del cicle del nitrogen en un sistema tancat com es un aquari. Tot i que no es necessari disposar d'un aquari, a nivell docent, es una eina que permet participar als estudiants en la seva preparació i manteniment d'un projecte comú. En cas de no disposar d'aquari, es recomana obtenir grava (~25g) d'una botiga d'aquariofília procedent d'un aquari ja establert i afegir aigua 250 ml. En aquest cas, el control negatiu de l'experiment vindrà donat per la mateixa quantitat de grava nova (sense utilitzar) en les mateixes condicions.



Un cop realitzades les rectes patró, es procedeix a analitzar les mostres per tal de determinar la concentració dels diferents analits. Aquestes determinacions han de fer-se (com a mínim) per triplicat i al llarg de diferents dies seguits per tal d'observar la variació dels diferents analits que formen part del cicle del nitrogen.

Poden disposar-se diferents vasos de precipitats modificant les condicions ambientals (quantitat de llum, calor, presència/absència matèria orgànica, alteracions pH, ...). A continuació, es mostra una taula d'exemple per la recollida de les dades (B+, grava amb bactèries; B-, grava sense bactèries).

	B+	B-	B+	B-	B+	B-	B+	B-
Dia	Temperatura		Llum		pH		Matèria Orgànica	
	Alta	Baixa	Si	No	Àcid	Basic	Si	No
1								
2								
3								
...								

7.3. ANÀLISIS

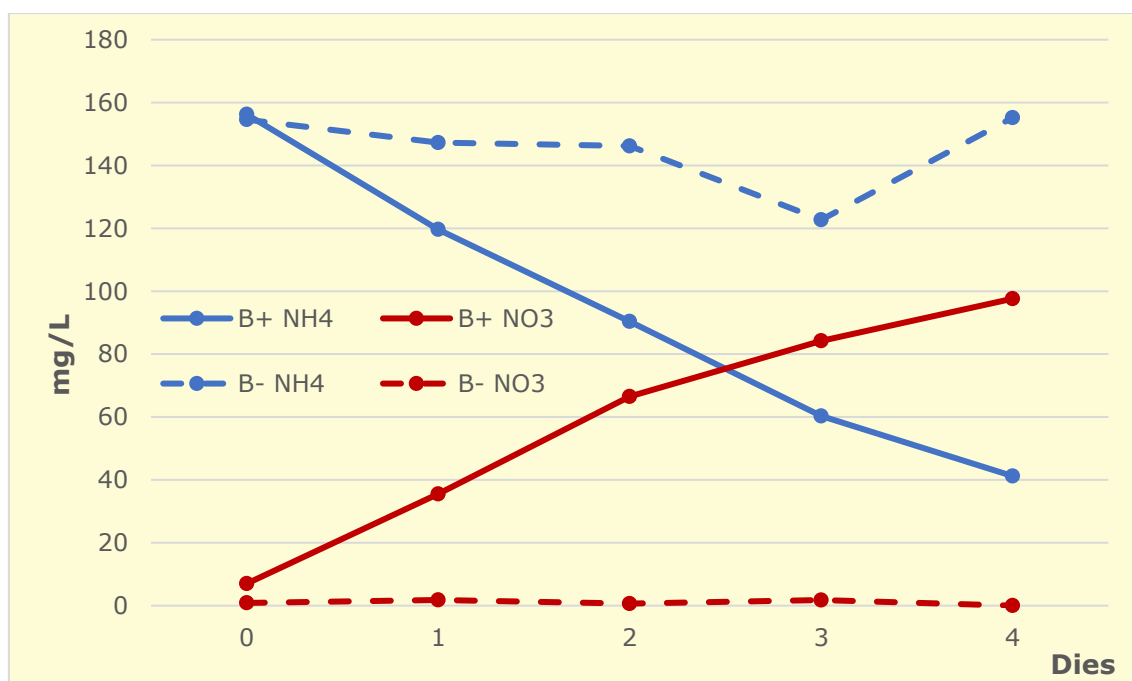
Al final d'aquesta activitat, els estudiants haurien de poder:

1. Demostrar les següents habilitats de laboratori:
 - a. Preparació de dissolucions
 - b. Tractament estadístic i gràfic de les dades obtingudes
 - c. Comportament solucions amortidores
 2. Demostrar els mètodes d'investigació científica per:
 - a. Recopilació i organització de dades
 - b. Anàlisi de dades
 - c. Elaboració i refutació d'hipòtesis
- Descriure el cicle del nitrogen i les conseqüències de la seva alteració.
 - Quin paper juga cada organisme en el cicle del nitrogen?
 - a. Peix: produeix amoníac a través de residus orgànics.
 - b. Nitrosomones: converteix amoníac en nitrit
 - c. Nitrobàcter: converteix el nitrit al nitrat
 - d. Plantes: les plantes consumeixen el nitrat
 - Graficar els resultats obtinguts. Incloure els tres compostos de nitrogen en un gràfic. Assegureu-vos d'incloure etiquetes correctes per als vostres eixos, una clau (llegenda) i un títol per a cadascun d'ells els vostres gràfics.
Pot utilitzar-se full mil·limetrat, eines ofimàtiques (Excel, Google Spreadsheet, LibreOffice) o llenguatges de programació (Bash, Python).
 - Respondre les següents preguntes segons les dades obtingudes.
 - A. Quin compost de nitrogen augmenta primer? Com es pot explicar això?
Amoníac. No hi ha un nombre suficientment elevat de bacteris capaces de transformar l'ió amoni en nitrats i/o existeix matèria en descomposició.
 - B. Quin compost de nitrogen va augmentar en segon lloc? Com es pot explicar això?
Nitrit. Les nitrosomones han establert colònies suficientment grans com per convertir quantitats significatives d'amoníac a nitri.
 - C. Quin compost de nitrogen va augmentar últimament? Com es pot explicar això?
Nitrat. S'han desenvolupat bacteris nitrobàcter i converteixen el nitrit en nitrat.
 - D. D'on poden provenir els bacteris que inicien el cicle del nitrogen dins l'aquari?
Transportats per l'aigua o peixos i aprofitant la porositat de la grava per a establir colònies de microorganismes.
 - E. Hi han resultats imprevistos? Explicar les possibles causes (mal estat reactius, rectes patró, manipulació mostres, hipòtesis de treball)
 - F. Si voleu iniciar un nou aquari, hi ha alguna manera d'accelerar el procés?
Afegint grava d'un aquari ja establert, es començaria amb una major quantitat de bacteris nitrosomones.
 - G. Sobre el pH...
 - i. Quan $\text{pH} = \text{pKa}$, quan serà logaritme $([\text{A}^-]/[\text{AH}])$? Serà 0, donat que l'àcid estarà dissociat un 50%
 - ii. Que succeeix quan el pH augmenta o disminueix en relació a la pKa?
La relació entre les formes del àcid dissociat i sense dissociar canviar en un factor de 10. Es a dir, si el pH de la dissolució es 6 y el pKa es 7, la relació $[\text{A}^-]/[\text{HA}]$ serà 0,1; si el pH fos 5, la relació seria 0,01 i si el pH fos 7, la relació seria 1.
 - H. Donat que les reaccions $\Delta G > 0$ (dissociació endotèrmica), la pKa disminueix quan la temperatura augmenta. Si la reacció es exotèrmica, s'espera el contrari. Que succeeix quan la Ka es elevada? Donat que $\text{pKa} = \log(\text{Ka})$, una elevada Ka implica que la reacció serà afavorida al augmentar la temperatura (principi de LeChâtelier)
 - Debatre les aplicacions dels coneixements sobre el cicle del nitrogen i els bacteris
 - o Agricultura (rotació de cultius)
 - o Medi-ambient (processos d'eutrofització, terraformació)

Exemples de dades recollides en les activitats proposades

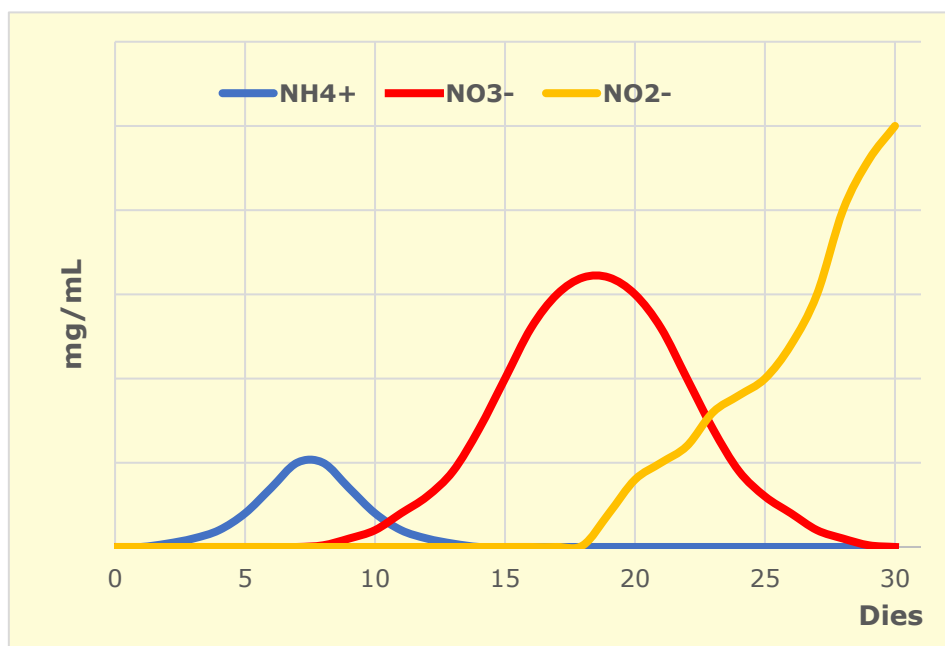
1. Quantificació NH_4^+ i NO_3^- en mostres d'aigua al llarg d'un breu període (4 dies) amb grava amb (B+) i sense (B-) bacteris nitrosomones.

Dia	B+		B-	
	NH_4^+	NO_3^-	NH_4^+	NO_3^-
0	156,24	7,01	154,56	0,87
1	119,65	35,51	147,27	1,79
2	90,36	66,52	146,18	0,63
3	60,3	84,2	122,7	1,77
4	41,2	97,63	155,21	0

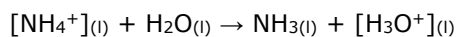


2. Quantificació de NH_4^+ , NO_3^- i NO_2^- en mostres d'aigua provinents d'un aquari nou, al llarg de diferents setmanes.

Dia	NH_4^+	NO_3^-	NO_2^-
0			
1			
2			
3			
...			



3. Determinació de la concentració de NH_3 i NH_4^+ per mitja en funció del pH.



$$K_A = 5.6 \times 10^{-10}$$

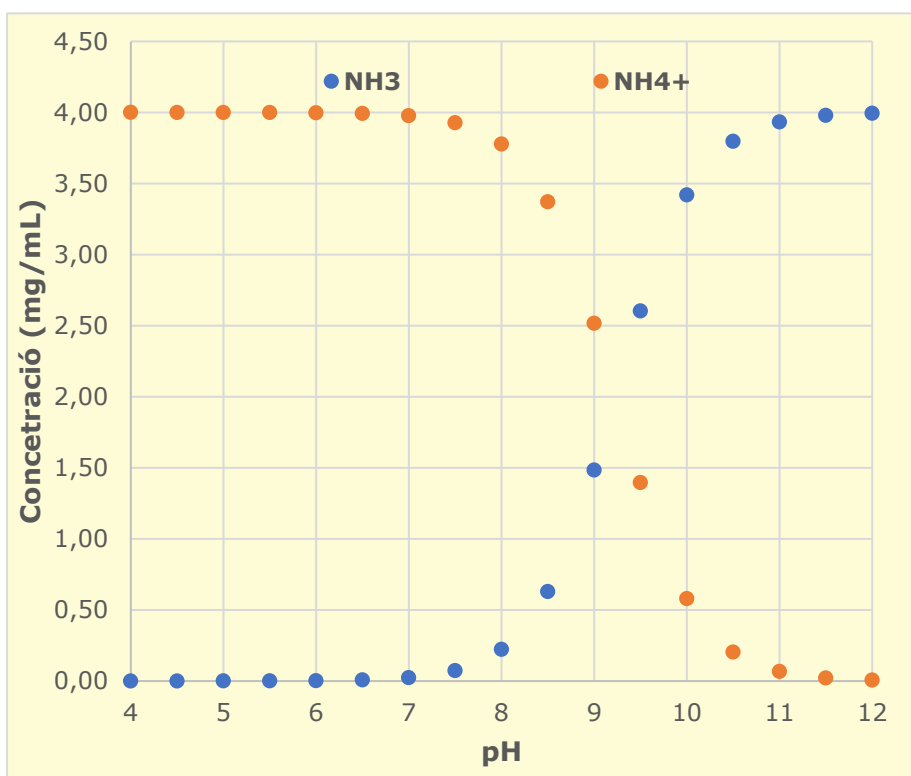
$$\text{p}K_A = 9.25$$

Temperatura = 22°C

$[\text{NH}_3 + \text{NH}_4^+] = 4 \text{ Mg/mL NH}_3$ (valor obtingut de la quantificació de $\text{NH}_3/\text{NH}_4^+$)

$$[\text{NH}_3] = \frac{[\text{NH}_3 + \text{NH}_4^+]}{(1 + 10^{(\text{p}K_A - \text{pH})})}$$

pH	NH_3	NH_4^+
0,0	0,0000	4,0000
0,5	0,0000	4,0000
1,0	0,0000	4,0000
1,5	0,0000	4,0000
2,0	0,0000	4,0000
2,5	0,0000	4,0000
3,0	0,0000	4,0000
3,5	0,0000	4,0000
4,0	0,0000	4,0000
4,5	0,0001	3,9999
5,0	0,0002	3,9998
5,5	0,0007	3,9993
6,0	0,0023	3,9977
6,5	0,0072	3,9928
7,0	0,0226	3,9774
7,5	0,0707	3,9293
8,0	0,2153	3,7847
8,5	0,6098	3,3902
9,0	1,4504	2,5496
9,5	2,5709	1,4291
10,0	3,4020	0,5980
10,5	3,7893	0,2107
11,0	3,9309	0,0691
11,5	3,9779	0,0221
12,0	3,9930	0,0070



7.4. CONSELLS PER A PREPARAR L'ACTIVITAT

- Podeu preparar l'aquari abans de la classe o permetre que els estudiants ho facin com activitat.
- Podeu dividir les tasques en grups, obligant-los a compartir o comparar les dades obtingudes.
- Recordeu prendre mesures d'amoníac, nitrit i nitrat per triplicat, durant un període de temps determinat (3-4 setmanes) 1 vegada al dia. Idealment, la anàlisi hauria de fer-se a hores similars (ex: 09:00 del matí, durant l'esbarjo, etc.).
- Realitzeu la anàlisi abans d'alimentar als peixos, donat que la matèria orgànica afegida provocarà un augment temporal de l'amoníac disponible.
- Eviteu que els estudiants col·loquin les mans a l'aigua del dipòsit per recollir les mostres. Les locions i olis a la pell poden contaminar les mostres i intoxicar als peixos. Utilitzeu una pipeta o un vas de precipitats per recollir les mostres d'aigua per analitzar.
- En cas de no poder disposar de grava per a l'experiment, podeu utilitzar una bomba d'aire per tal de veureu com afecta l'oxigenació de l'aigua en l'evolució dels anàlisis.
- En funció de la mida del vostre tanc, haureu de modificar el nombre de peixos i/o plantes que el vostre sistema (*aka* aquari) suportar. Per a l'elecció de peixos i plantes, les tendes especialitzades us poden orientar en funció de les vostres necessitats (pressupost, mida, manteniment, etc...)
- Eviteu col·locar el tanc a la llum directa del sol. Això provocarà un creixement excessiu d'algues.

9. BIBLIOGRAFIA

Atkins CG. et al., Demonstration of the Spectrophotometric Complementary Color Wheel Using LEDs and Indicator Dyes. *Journal of Chemical Education*, 93 (1), 162-165 (2016). DOI:10.1021/acs.jchemed.5b00665

Bernhard A. The Nitrogen Cycle: Processes, Players, and Human Impact. *Nature Education Knowledge*, 3(10):25 (2010)

Bess W, Jensen M. The microbial nitrogen cycle, Bess B Ward et al., *Front Microbiol.* 2014; 5: 553 (2014). DOI:10.3389/fmicb.2014.00553

Canfield DE. et al. The Evolution and Future of Earth's Nitrogen Cycle. *Science* 330, 192 (2010); DOI:10.1126/science.1186120

Compiled from Appendix 5 Chem 1A, B, C Lab Manual and Zumdahl 6th Ed. The pKa values for organic acids can be found in Appendix II of Bruice 5th Ed.

Gilliam MB. et al., A spectrophotometric assay for nitrate using NADPH oxidation by *Aspergillus* nitrate reductase. *Anal. Biochem.*, 212(2), 359-365 (1993).

Goldberg, R.; Kishore, N.; Lennen, R. (2002). "Thermodynamic Quantities for the Ionization Reactions of Buffers" (PDF). *J. Phys. Chem. Ref. Data*. 31 (2): 231-370. DOI:10.1063/1.1416902

Krom MD. Spectrophotometric determination of ammonia: a study of a modified Berthelot reaction using salicylate and dichloroisocyanurate. *Analyst*, 105, 305-316 (1980). DOI:10.1039/AN9800500305

Reijenga J, van Hoof A, van Loon A, Teunissen B. Development of Methods for the Determination of pK_a Values. *Analytical Chemistry Insights*. 2013;8:53-71. DOI:10.4137/ACI.S12304.

van Kreef, B. K. (1985), The estimation of the apparent standard free energy change ΔG_{app} of a biochemical reaction from the standard free energy of formation and apparent free energy of ionization of the participating molecules and its application to the reactions of the purine metabolism. *Biochem. Educ.*, 13: 125-130. DOI:10.1016/0307-4412(85)90187-6

Recerca en Acció www.recercaenaccio.cat

Lenntech, Water Management Solutions <http://www.lenntech.com>

Qualitat Ecològica dels Rius de la Província de Barcelona. <http://www.ub.edu/barcelonarius/web/>

MicroWiki, University of Kenyon <https://microbewiki.kenyon.edu>

Agència catalana de l'aigua, Generalitat de Catalunya <http://aca-web.gencat.cat>

Enzymatic assays protocols, Sigma-Aldrich <https://www.sigmaaldrich.com>

Advanced Aquarist, Pomacanthus Publications LLC. <http://www.advancedaquarist.com>