

Medida de la respiración mediante cambios *in vitro* de la concentración de O₂

¹Aristegui, J.; P. Mazuecos², I.; Vázquez-Domínguez^{3,4}, E.

¹*Instituto de Oceanografía y Cambio Global,
Universidad de Las Palmas de Gran Canaria*

²*Departamento de Ecología Facultad de ciencias, Universidad de Granada*

³*Departamento de Biología Marina y Oceanografía,
Institut de Ciències del Mar (CSIC)*

⁴*C.O. Gijón. Instituto Español de Oceanografía*

Finalidad. Campo de aplicación

Determinación de la respiración en el océano profundo mediante cambios en la concentración de oxígeno disuelto dentro de botellas, utilizando el método Winkler.

El oxígeno es un elemento directamente relacionado con el metabolismo aeróbico de los organismos vivos. Se produce en reacciones anabólicas tales como la fotosíntesis y se consume en reacciones catabólicas como la respiración. Por tanto, la determinación de su concentración en medio acuático proporciona información muy valiosa sobre los procesos biológicos y balances metabólicos en ecosistemas acuáticos.

Aunque la determinación química de oxígeno disuelto en muestras de agua fue descrita por primera vez en el siglo XIX (Winkler, 1888), las medidas de metabolismo planctónico basadas en cambios en la concentración de oxígeno no fueron introducidas hasta el inicio del siglo XX por Gardner y Gran (1927). El método Winkler está basado en que el oxígeno de las muestras de agua marina oxida el ión yoduro a yodo y la cantidad de yodo generado es determinado mediante titración con una solución de concentración conocida de tiosulfato sódico. La cantidad de oxígeno disuelto se calcula a partir del volumen de tiosulfato añadido durante la titración hasta alcanzar el punto final. Este método ha sido uno de los más usados, no solo por su simplicidad, sino también debido a su precisión; sobre todo gracias al desarrollo de sistemas automatizados con detección del punto final de la valoración, bien potenciométrica o colorimétrica, que han aumentado considerablemente la sensibilidad del método.

Conceptos generales

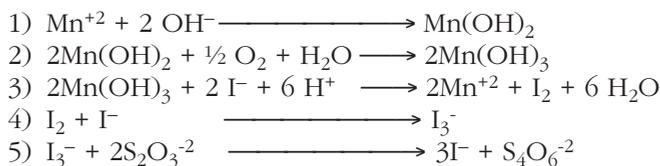
La técnica que se describe en este protocolo está basada en la incubación de muestras de agua de mar en botellas DBO (Demanda Biológica de Oxígeno) de c.a. 100 ml de capacidad. Varias de estas botellas son usadas para establecer la concentración inicial de oxígeno (Botellas iniciales; Bi), mientras que otra serie de botellas se incuban en oscuridad a temperatura in situ ($\pm 0,1$ °C) durante aproximadamente 24-72 h (Botellas oscuras: Bo). La respiración se obtiene, bien mediante la diferencia en la concentración de oxígeno entre el tiempo inicial y final del experimento, o como la pendiente de la recta de regresión debida a la disminución de oxígeno a lo largo del tiempo (e. g. Arístegui et ál. 2005).

Para evitar problemas de interacción entre la fase acuosa y la atmósfera es muy importante que las botellas estén completamente sumergidas en agua (por encima del tapón) durante la incubación, incluso una vez que se han fijado las muestras y hasta el momento de ser valoradas. Si no, podría haber intercambio de gases entre el aire y el agua de las botellas (por diferencias en la presión parcial de los gases), creándose burbujas de aire que alterarían la concentración de oxígeno o el volumen real de líquido a valorar.

Para la preparación y dosificación de los reactivos que se añaden al agua de mar para fijar la muestra, se siguieron las recomendaciones hechas por Carpenter (1965) y Carrit y Carpenter (1966). La detección del punto final de la valoración Winkler se llevará a cabo espectrofotométricamente, mediante un sistema comercial (DOA SiS) automatizado, controlado por un microprocesador, basado en el sistema descrito por Williams y Jenkinson (1982).

Las reacciones que tienen lugar para la determinación de la concentración de oxígeno disuelto son las siguientes:

Una vez añadidos el reactivo 1 –sulfato de manganeso (MnSO_4)– y el reactivo 2 –solución alcalina de yoduro e hidróxido sódico ($\text{NaOH} + \text{NaI}$ –, las botellas son cerradas cuidadosamente (evitando la aparición de burbujas) y agitadas vigorosamente (para facilitar la reacción). El oxígeno disuelto químicamente reacciona con $\text{Mn}(\text{OH})_2$ en un fuerte medio alcalino resultando en un precipitado marrón de $\text{Mn}(\text{OH})_3$. Después de la fijación y precipitación completa del oxígeno, las botellas permanecen en reposo (bajo el agua) unas horas antes de su análisis. Previamente al análisis, la muestra es acidificada a pH 2.5 – 1.0, provocando que los hidróxidos precipitados sean disueltos, liberando Mn^{+3} . Los iones Mn^{+3} oxidan el yoduro (I^-) a yodo (I_2). El yodo forma un complejo con el exceso de los iones yoduro, siendo determinado mediante titración con tiosulfato ($\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$) que es oxidado a tetrionato ($\text{S}_4\text{O}_6^{2-}$).



La fijación de oxígeno es una reacción muy rápida debido a la inestabilidad del Mn^{+2} en medio alcalino.

El método está descrito en detalle en Strickland y Parsons (1977).

Equipamiento necesario

- Analizador de oxígeno disuelto (DOA) de “Sensoren Instruments Systems” compuesto por:
 - Bureta Dosimat (Methrom) para dosificar el tiosulfato.
 - Soporte para botella con agitador magnético.
 - Espectrofotómetro con lámparas y fotomultiplicador.
 - Unidad de control e interfaz A/D.
 - Ordenador PC con “*software* DOA SiS” para controlar automáticamente la valoración.
- Botellas de borosilicato DBO.
- Baño termostatzado / refrigerado con cubeta para incubar las muestras.
- Agitadores magnéticos (recubiertos de cristal) y varilla para recogerlos.
- Pipetas automáticas de repetición eppendorf (con cánulas de 12.5 ml) para dispensar los reactivos 1 y 2 (o bien dosificadores de precisión de 1 ml).
- Pipeta automática (y puntas) de 1 ml para dosificar el ácido.
- Bureta Dosimat (Methrom) para dosificar el yodato potásico.
- Botes Pyrex para almacenar reactivos. El reactivo 2 es fotosensible, la botella debe ser ámbar (opaca) o recubierta con papel de aluminio.
- Tubos de silicona para llenar las botellas DBO.
- Ácido clorhídrico y barreño con tapa para lavar las botellas DBO.
- Barreño para mantener las botellas sumergidas en agua antes de valorarlas.
- Termómetro.
- Guantes.
- Bata y gafas de seguridad.
- Botellas para residuos de reactivos (p. e. tiosulfato sódico).

Reactivos u otro material fungible

Reactivos:

- *Reactivo 1* (para fijar el O₂ de las muestras): Sulfato de manganeso (MnSO₄ · 4 H₂O).
- *Reactivo 2* (para fijar el O₂ de las muestras): Solución alcalina compuesta por hidróxido sódico (NaOH) y yoduro sódico (NaI).
- Ácido sulfúrico (H₂SO₄), para acidificar la muestra previa a su valoración.
- Tiosulfato sódico (Na₂S₂O₃ · 5 H₂O), para la valoración del O₂.
- Yodato potásico (KIO₃), para la estandarización del tiosulfato.

Preparación de reactivos:

Los reactivos deben mantenerse en el frigorífico (~ 4 °C) mientras no se usen.

Reactivo 1: Disolver 450 g de sulfato de manganeso MnSO₄ * 4H₂O en 500 ml de agua destilada en una botella de 1 l. Aforar a 1 l con agua destilada y almacenar en una botella de cristal con tapón a rosca (Pyrex).

Reactivo 2: (NaI+NaOH, solución alcalina de yoduro sódico): disolver 320 g de NaOH en 400 ml de agua destilada en una botella de 2 l. Esperar a que se enfríe y entonces añadir 600 g de NaI (mezclar muy bien para disolver). Una vez fría, la solución es transferida a un matraz aforado de 1 l y rellenada con agua destilada. Almacenar en botella de cristal con tapón de plástico a rosca (Pyrex).

Ácido sulfúrico H₂SO₄ 5 M: 280 ml de ácido sulfúrico en 500 ml de agua destilada en una botella de 1 l. La solución es almacenada fría y entonces llevada a 1 l con agua destilada.

Nota: si este reactivo toma un color extraño, debe ser preparado de nuevo.

Solución de tiosulfato sódico 0.25 M: disolver 62.04 g Na₂S₂O₃ * 5H₂O en un 1 l de agua destilada. La solución es almacenada en una botella ámbar con el tapón a rosca.

Estándar de yodato potásico, 0.001666 M: secar ~ 0.5 g KIO₃ a 105 °C durante 1 h. Esperar a que se enfríe y pesar exactamente 0.3567 g de KIO₃. Disolver en 100 ml de agua destilada y llevar a 1 l con agua destilada.

Nota: En el caso de que se use un estándar certificado 0.1 N de KIO₃, concentración final de una ampolla de 100 ml [titrisol Merck] es llevada hasta 1 l con agua ultrapura (Milli-Q). Esta solución es diluida a 0.01 N con agua ultrapura antes de usarla como estándar.

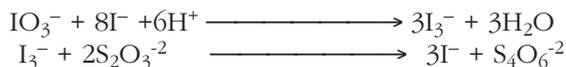
Calibración

Calibración del volumen de las botellas DBO

Para determinar el volumen exacto de las botellas de borosilicato DBO, se deben pesar vacías y llenas de agua ultrapura (controlando la temperatura del agua) en una balanza de alta precisión ($300 \pm 0.0001\text{g}$). El volumen se determina a partir de la diferencia de ambos pesos, corrigiendo para el coeficiente de expansión de borosilicato, obtenido a partir de la densidad del agua (Kell, 1975). La calibración del volumen de las botellas DBO debe ser realizado de forma muy precisa, ya que la precisión del método depende de ello.

Estandarización del tiosulfato

El tiosulfato puede variar su molaridad por diversos motivos (e. g. cambios bruscos de temperatura), por lo que es conveniente estandarizarlo frecuentemente, y siempre una vez que se preparan reactivos nuevos. Para ello se utiliza una solución estándar de yodato potásico (KIO_3). Bajo condiciones ácidas el yodato reacciona con los iones yoduro hacia yodo, el cual es titrado con tiosulfato.



Para la estandarización se añaden los reactivos en orden inverso: Primero añadir 1 ml de H_2SO_4 , seguido por 1 ml de solución alcalina (reactivo 2) y por último 1 ml de sulfato de manganeso (reactivo 1) sobre 80-100 ml de agua ultrapura o agua marina contenida dentro de una botella BDO. Después se añaden 10 ml de la solución estándar de yodato potásico con una bureta Dosimat (o similar) con una precisión superior a $1 \mu\text{l}$. Es muy importante agitar y mezclar bien la muestra entre dosificaciones. El yodo se valora con la solución de tiosulfato apropiada y la molaridad se calcula como sigue:

$$M_t = (V_i \times M_i \times 6) / V_t$$

Donde M_t : molaridad del tiosulfato (M), V_t : volumen de tiosulfato añadido (l), V_i : volumen de estándar de yodato potásico añadido (ml) y M_i : molaridad del estándar del yodato (M).

Blancos

Para probar que los reactivos están en buenas condiciones, se deben llevar a cabo controles esporádicos, añadiendo los reactivos de forma inversa; similar al proceso de estandarización, pero sin añadir el yodato potásico. Si el resultado del proceso produce color en los reactivos (debe de estar totalmente transparente) habría que cambiar de reactivos.

Descripción de la técnica

Toma de muestras y preparación de incubaciones

Las muestras de agua de mar se recogen mediante botellas Niskin y se vierten a una garrafa de plástico (20 l). Para evitar problemas de sub-saturación, la garrafa se agita suavemente antes de dispensar el agua con una manguera de silicona, de forma homogénea, en las botellas para DBO. El extremo del tubo de silicona se coloca en el fondo de la botella para eliminar las burbujas de aire que podrían permanecer dentro. Las botellas deben ser llenadas dispensando al menos 2 veces su volumen de agua, y de forma aleatoria. Una vez llenadas, las botellas se colocan en el incubador (baño termostatzado) para comenzar el experimento de respiración. El proceso de llenado debe de realizarse en una zona fresca / fría y en penumbra, evitando la luz directa en las garrafas y las botellas.

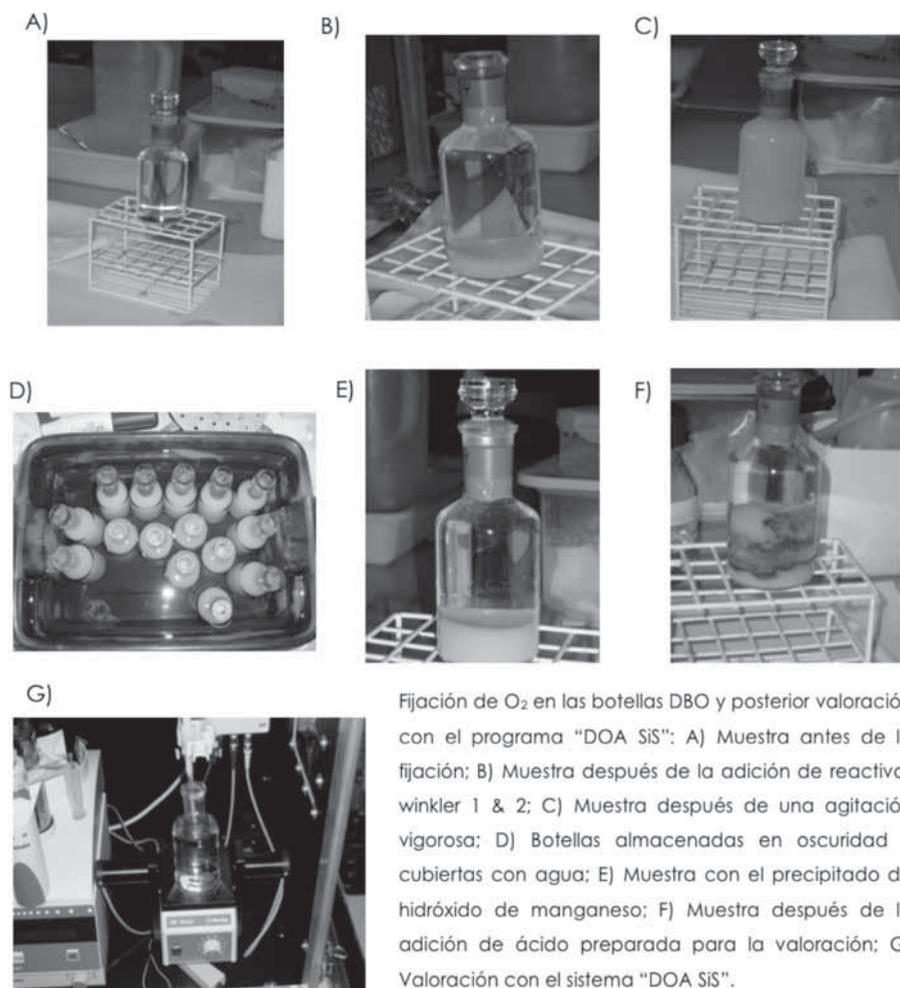
Fijación de O₂

Las muestras (de 4 a 6 replicados por tiempo) se fijan a intervalos establecidos (e. g. 0h, 12h, 24h, 36h, 48h, 72h) tal y como se ha explicado en el apartado 5, añadiendo los reactivos 1 y 2 sucesivamente. Las botellas deben agitarse vigorosamente al menos dos veces, con un intervalo de unos 5 minutos, para que se forme bien el precipitado, y mantenerlas sumergidas en agua hasta su valoración. Para fijar las botellas iniciales (T0) se debe esperar al menos unas 2 h de incubación para que la temperatura dentro de todas las botellas sea exactamente la misma que la del agua del incubador.

Valoración de las muestras

Cuando el precipitado esté sedimentado (aproximadamente entre 8 y 24 horas; ver Figura E), y nunca después de 48h, se deben valorar las muestras. Retirar el tapón de la botella con cuidado de que no entre agua en el interior y añadir 1 ml de H₂SO₄ (inclinando la botella). Insertar la mosca magnética en el fondo de la botella con la varilla, sin provocar burbujas. Colocar la botella sobre el soporte del DOA con el agitador y comenzar la valoración automática con tiosulfato sódico. Al final de la titración, el programa genera una copia de los detalles de la muestra y del proceso de valoración, junto con las estimas de la concentración de oxígeno y porcentajes de saturación.

Cuadro sinóptico de la técnica



Cálculo de los resultados

Debe calcularse el valor medio (en $\mu\text{mol O}_2 \text{ l}^{-1}$), coeficiente de variación y error estándar de cada grupo de replicados de botellas. Como estima de referencia, la precisión de los replicados debe ser $\text{CV} < 0.5\%$ para poder detectar cambios significativos en la respiración. En cualquier caso, debería de comprobarse que la diferencia entre valores medios (con sus errores estándar) de grupos de replicados son significativas.

Control de calidad y errores experimentales

A pesar de la precisión del método, las tasas respiratorias que se miden en el océano oscuro son tan bajas ($<1 \mu\text{mol O}_2 \text{ l}^{-1} \text{ d}^{-1}$) que conviene tener en cuenta algunos aspectos metodológicos importantes que pueden condicionar la estima correcta de estas tasas.

1. Tanto la detección fotométrica como espectrofotométrica del punto final de la valoración son muy precisas, pero a menudo el método potenciométrico implica retirar una alícuota de la botella sobre la que se inserta el electrodo y se hacen las mediciones. En este proceso se puede perder precisión por dos causas: (i) Pérdida por volatilización de I_3^- en el proceso de manipular la alícuota, y (ii) control menos preciso en el volumen de la alícuota con respecto a la calibración más exacta del volumen total de la botella
2. El volumen de las botellas debe de ser determinado con una precisión de milésima de gramo, ya que la precisión del método depende en gran medida de lo bien calibradas que estén las botellas
3. Es crítico el control de la temperatura durante todo el proceso de incubación. Generalmente los cambios de oxígeno por procesos físicos (e. g. variación de $> 0.5 \text{ }^\circ\text{C}$) son mucho más acusados que los que se producen por el metabolismo microbiano.
4. Es importante controlar que no se produzca ninguna burbuja ni durante la incubación ni tras haber fijado la muestra con los reactivos 1 y 2 y una vez puesto el tapón. Cualquier botella con burbuja (por pequeña que sea) debe ser desechada.
5. Comprobar frecuentemente la molaridad (M) del tiosulfato. Dosificar con mucha precisión ($< 1 \mu\text{L}$) el yodato, con el fin de obtener una buena replicabilidad en las estimas de M.

Referencias

- ARÍSTEGUI, J., C. M. DUARTE, J. M. GASOL, L. ALONSO-SÁEZ L. 2005. «Active mesopelagic prokaryotes support high respiration in the subtropical northeast Atlantic Ocean». *Geophys. Res. Lett.* Vol. 32, L03608, 4 pp.
- CARRIT, D. E., J. H. CARPENTER. 1966. «Comparison and evaluation of currently employed modification of the winkler method for determining dissolved oxygen in sea-water». *J. Mar. Res.* 24: 286-318.
- CARPENTER, J. H. 1965. «The Chesapeake Bay Institute. Technique for the winkler oxygen method». *Limnol. Oceanogr.* 10: 141-143.
- GRASSHOFF, K., M. EHRHARDT, K. KREMLING. 1983. *Methods of Seawater Analysis*. Eds Verlag Chemie GmbH. 419 pp.
- KELL, G. S. 1975. «Density, Thermal Expansivity, and Compressibility of Liquid Water from 0° to 150 °C: Correlations and Tables for Atmospheric

- Pressure and Saturation Reviewed and Expressed on 1968 Temperature Scale». *J. Chem. Eng. Data.* 21: 91-105.
- STRICKLAND, J. D. H., T. R. PARSONS. 1968. «Determination of dissolved oxygen in A Practical Handbook of Seawater Analysis». *J. Fish. Res. Board.* 167: 71-75.
- WEAST, R. C. 1973. *Handbook of chemistry and physics.* 59th Ed. CRC Press. pp. 1978-1979.
- WILLIAMS, P. J. LEB., N. W. JENKINSON. 1982. «A transportable microprocessor-controlled precise Winkler titration suitable for field station and siphon-board use». *Limnol. Oceanogr.* 27 (3): 2843-2855.
- WINKLER, L. W. 1888. «Die Bestimmung des in Wasser gelösten Sauerstoffes». *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* 21: 2843-2855.