

APLICACION DE LA METODOLOGIA DE ALTA SENSIBILIDAD A LA DETERMINACION DE NITRITO EN AGUA DE MAR. ALGUNOS EJEMPLOS.

J. Pérez Marrero, M.J. Rueda, O. Llinares. Centro de Tecnología Pesquera del Excmo. Cabildo Insular de Gran Canaria. Taliarte, Apdo 56, Telde 35200 Gran Canaria.

Resumen

Se ha realizado la puesta en marcha de la metodología de Oudot y Montel(1988) para la determinación de alta sensibilidad de nitrito en un Autoanalizador Technicon AII. A pesar de la introducción de modificaciones necesarias para su adaptación a las disponibilidades instrumentales, el funcionamiento ha sido satisfactorio.

La metodología presenta como ventaja, respecto a otras publicadas, que se mantiene el análisis continuo con flujo segmentado, que es una metodología bastante generalizada en los laboratorios de estudios marinos.

S se presenta como ejemplo de aplicación la medida de variación en el tiempo de la concentración de nitrito en acuicultura, donde en general, esta medida se utiliza como control de calidad del agua. Obteniendo el índice de producción por unidad de biomasa para *Sparus Aurata* L. en distintas edades.

En aguas naturales, se presentan las determinaciones de los perfiles verticales sobre el talud del sur de la isla de Gran Canaria, donde se puede apreciar la mejora de detalle que introduce esta metodología.

Summary.

We have put into practice the methodology of Oudot and

Montel (1988) to determine nitrites with high sensitivity, using an Autoanalyzer Technicon AII. In spite of the introduction of the modifications necessary for its adaptation to the instruments available, its functioning has been satisfactory.

This methodology has one advantage with respect to the other methodologies that have been described which is continuos analysis with segmented flow which is a methodology fairly widespread in the laboratories of marine studies.

Its application in the measurement of variation in time of the concentration of nitrite in aquaculture is presented here as an example. In general, this measurement is used as a control of the quality of water. We have obtained the rate of production per unit of biomass of Sparus Aurata L. at different ages.

In natural waters, we have obtained vertical profiles of the concentration of nitrites on the slope to the south of Gran Canaria, where we can appreciate the improved detail offered by this methodology.

#### INTRODUCCION:

Los nitritos son una forma poco abundante de encontrar el Nitrógeno en el Océano, fundamentalmente por ser una especie inestable en las condiciones normales del mismo. Sin embargo, resulta de gran importancia su determinación, dado que es una de las formas intermedias en las que se puede encontrar el nitrógeno cuando pasa de las formas reducidas en que se encuentra en la materia orgánica (disuelta o particulada), a la forma estable y más abundante en disolución que es el nitrato. Por lo que sus variaciones espacio-temporales son indicativas de la dinámica de tales procesos. (Carpenter y Capone ,1983).

Por la gran fiabilidad de los métodos de determinación del nitrito en agua de mar, se ha utilizado la reducción de nitrato a nitrito como paso previo para la cuantificación de éste. En la bibliografía general, las distribuciones espaciales y temporales, tanto de nitrato como de nitrito, en aguas oceanicas oligotróficas, presentan discontinuidades como consecuencia de los límites de detección de los métodos colorimétricos al uso.

La atención que sobre los ciclos de estas sustancias se

deriva de la existencia de programas como el JGOF y las propias características oligotróficas de las aguas en torno a las Islas Canarias, ha impulsado el presente trabajo con el objetivo central de poner a punto y comprobar la eficacia de alguno de los métodos descritos; para su utilización tanto en el mar, como en los laboratorios del Centro de Tecnología Pesquera de Gran Canaria.

#### COMPARACION DE LOS METODOS EXISTENTES PARA LA DETERMINACION DE NITRITOS EN AGUA DE MAR:

Se revisaron las metodologías analíticas para esta especie en agua de mar susceptibles de ser empleadas en nuestro laboratorio, encontrándose que pertenecen a dos tipos generales: Métodos basados en la quimiluminiscencia, (Garside, 1982) y métodos colorimétricos, tanto en su versión manual como en flujo continuo (segmentado e inyección en flujo) : Grasshoff et al (1983), Hansen y Grasshoff (1983), Oudot y Mountel (1988) y Gonçalves y Harrenoes (1985).

MÉTODO	REACTIVOS	LÍMITE DETECCIÓN	DISPONIBILIDAD	VELOCIDAD MUESTREO
Colorimétrico standard manual	SA: exceso MED: exceso	100 nmol dm <sup>-3</sup>	E=0.020 pmol dm <sup>-3</sup>	
Colorimétrico standard automatizado	SA: MED: 1dm	100 nmol dm <sup>-3</sup>	E=0.020 pmol dm <sup>-3</sup>	
Colorimétrico modificado	SA: MED: 1dm	50 nmol dm <sup>-3</sup>		24 horas
Quimiluminiscencia	Dosero	10-20 nmol dm <sup>-3</sup>	E=0.002 pmol dm <sup>-3</sup>	12 horas

Tabla 1: Comparación de los métodos para la determinación de nitritos.

A pesar de no ser el de mayor sensibilidad, de entre ellos se escogió, el método colorimétrico en flujo continuo segmentado; que es una técnica ampliamente utilizada en laboratorios de oceanografía, (Grasshoff et al, 1983), por la disponibilidad de los materiales y el costo.

Estos métodos se basan en la conocida reacción de Griess, consistente en la reacción del nitrito con una amina aromática para formar una sal de diazonio, que en un segundo paso se copula con otra amina aromática dando lugar a un colorante azoico,

adaptada para el agua de mar por Bendschneider y Robinson (1952).

#### PROCEDIMIENTO:

' la concentración de NED es cuatro veces superior a la empleada en las otras metodologías

Se escogió la configuración propuesta por Oudot y Mountel (figural) (op.cit.) que es a su vez una modificación de la metodología más tradicional que se recoge en Grasshoff. Las modificaciones principales que estos autores proponen son:

-Aumento de la proporción Mountel muestra/reactivos.

-Aumento del tiempo de reacción.

-Aumento de la amplificación de la señal.

La segunda de las modificaciones resulta crítica porque en los autoanalizadores, el aumento del tiempo significa colocar mayor longitud de tubuladura. Al no disponer de serpentines de la longitud requerida, se ha tenido que completar ésta por medio de empalmes (siete), con lo que aumentó la resistencia al paso de los reactivos, obteniéndose un flujo poco uniforme con el resultado de disturbios ritmicos en el registro (figura 2.a).

Para corregir esto se optó por aumentar proporcionalmente los caudales de entrada y rebombeo, obteniéndose una sensible mejora en la relación señal/ruido (figura 2.c).

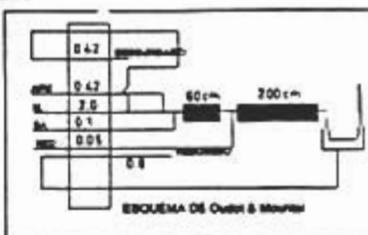


fig. 1: Esquema de Oudot y

	lit/min <sup>1</sup>	lit/min <sup>2</sup>
MUESTRA	2.0	2.5
AIRE	0.42	0.42
AGUA	0.1	0.32
REBOMBE	0.05	0.16
DEARRABUJADOR	0.42	

Tabla 2. 1= configuración inicial (Oudot y Mountel)

2= configuración final del presente trabajo.

CALIBRADO:

Se comienza trabajando en modo Damp 1, con una moderada amplificación de la señal (Standard calibre=4.80), con el fin de que los disturbios producidos por las pulsaciones en el flujo (debidos a las pérdidas de carga) tuvieran el menor tamaño

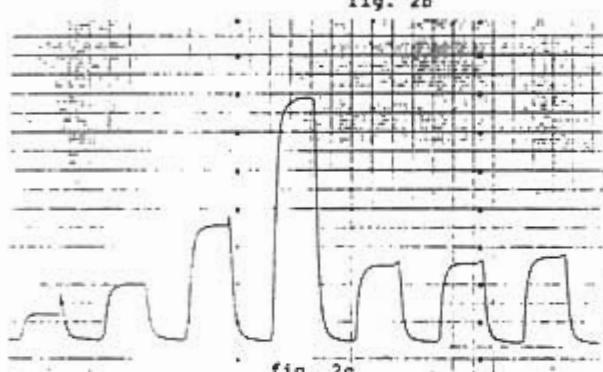
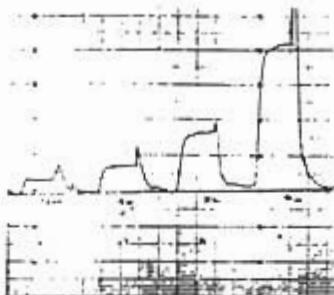


fig. 2: Efecto de la leva y del caudal sobre la señal.a: leva 40 muest hr<sup>-1</sup>, muest/lavado 1/1 (40.1,1). b: leva 25.1,1. c: leva 25.1,1 con aumento máximo de caudales.

possible.

Se prepararon una serie de patrones con nitrito sódico en agua destilada, de concentraciones 0.04 0.08, 0.1, 0.2, 0.4 y 1.0  $\mu\text{mol}(\text{NO}_2^-)/\text{dm}^3$ , que se pasaron repetidas veces (Standard Calibre =4.80) con el objeto de comprobar la reproducibilidad y el comportamiento lineal de las medidas.

Se repitió el proceso aumentando progresivamente la amplificación de la señal con valores de standard calibre 5.0, 6.0, 7.0 y 8.0, dando en todos los casos una buena correlación entre altura de pico y la concentración de los estandares.

#### RESULTADOS:

Se convirtieron los resultados de altura de pico (mm) a unidades de absorbancia mediante la curva de calibrado que proporciona el fabricante del instrumento. Esta medida resulta independiente de la amplificación elegida. No obstante, al realizar un análisis de regresión con los valores obtenidos para los patrones con todas las amplificaciones empleadas, se encontró una ligera dependencia de la pendiente de la recta de regresión con la calibración interna empleada.

Cal. INT	r	pend. UM.cm <sup>-1</sup>	t <sub>reg.</sub> %	n
5.0	.99979	1.34	4.17	22
5.0C	.99975	1.23		4
6.0	.99914	1.20		4
7.0	.99925	1.20		4
8.0	.99965	1.47	2.71	15
Todas las series	.9994	1.34	7.19	49

Tabla 3. Rectas de calibrado según calibración interna.

Se tiene entonces una metodología precisa para el rango de las centésimas de  $\mu\text{mol}$ , cuando se trabaja con una amplificación grande (standard calibre = 8.0), con un error relativo máximo, obtenido de la desviación estandar, de 2.71 %.

Se han efectuado dos ejercicios de comprobación de la metodología frente a problemas prácticos de interés para nuestro laboratorio:

#### 1.-Obtención de un perfil de concentración de nitrato con la profundidad en aguas de Canarias (oligotróficas).

Durante el mes de diciembre de 1991 se ha realizado una campaña oceanográfica en el B/O Taliarte en aguas al SW de Gran Canaria. Se presentan aquí los perfiles de concentración con la profundidad de la estación nº4, situada sobre el talud, con una profundidad de 560 m. Donde se muestraron las profundidades de: 10, 20, 30, 40, 50, 75, 100, 150, 200, 300, 400 y 500 m.

El perfil vertical de la concentración de nitritos presenta (figura 3), la posibilidad de discriminar claramente algunas características que podrían pasar desapercibidas utilizando metodologías habituales. En él se pueden observar cuatro zonas

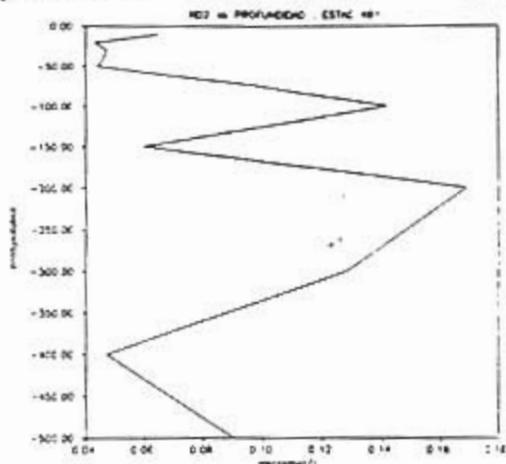


fig 3. Perfil de concentración de  $\text{NO}_2$ .

tier definidas: La primera que alcanza hasta los 50m de profundidad, que corresponde a la capa superficial de mezcla, como queda señalado en el perfil de temperaturas (figura 4).

La segunda presenta un maximo bien definido a los 100m de profundidad justo por debajo de la profundidad en que la actividad fotosintética es máxima (50m), como se observa en la distribución vertical de oxígeno (figura 5). A continuación y en la capa entre 150 y 400m se sitúa el máximo absoluto encontrado en esta estación, que se sitúa en el seno de la masa de Agua Central Noratlántica (NACW), bien separada de la capa superior por la inflexión entre la termoclina estacional y la permanente, que se sitúa a 150m. A 500 m en la capa mas profunda se encuentra un máximo relativo que debe estar ligado a procesos de oxidación de la materia orgánica que ocurren en el fondo, muy próximo a este nivel. Esta distribución puede considerarse como frecuente

en el océano ((Vaccaro, 1965),(Olsen, 1981),(Wada y Nettori 1991)) y en Canarias (León y Braun, 1973). Lo que cabe destacar de la metodología empleada es su capacidad de resolución.

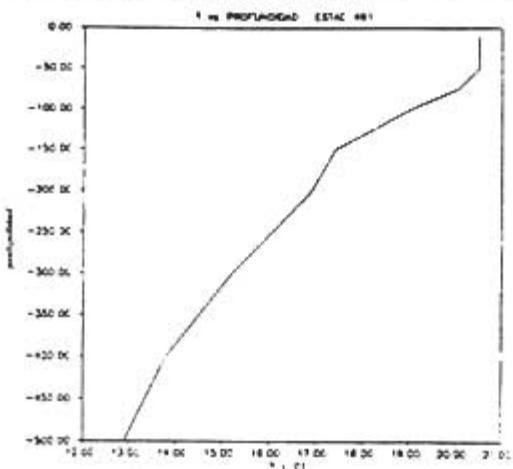


fig.4: Perfil de temperatura.

2.-Obtención de la tasa de acumulación de nitrato en tanques de cultivo de Dorada (*Sparus Aurata L*) en función de la biomasa.

El nitrato es un parámetro importante en la determinación de la calidad del agua para acuicultura por dos razones: puede reaccionar con la hemoglobina de los peces formando metahemoglobina, menos eficaz en el transporte de oxígeno, provocando la muerte de los peces por hipoxia (Brown blood disease).(Boyd,1982)

Pero más importante que ésto, es que la medida de la acumulación de nitratos resulta ser un parámetro útil para medir el equilibrio dinámico entre los dos procesos sucesivos de oxidación (nitrificación) bacteriana del N desde la forma reducida en que es excretado ( $NH_4^+$ ) hasta la forma oxidada e inocua nitrato.(Boyd, op.cit.)

Se presentan aquí los resultados obtenidos para tres tanques experimentales de cultivo de dorada con las siguientes características:

Tanque n°1: 6000 l. 100 individuos reproductores. Sin alimentación. Circuito de agua cerrado y aireación.

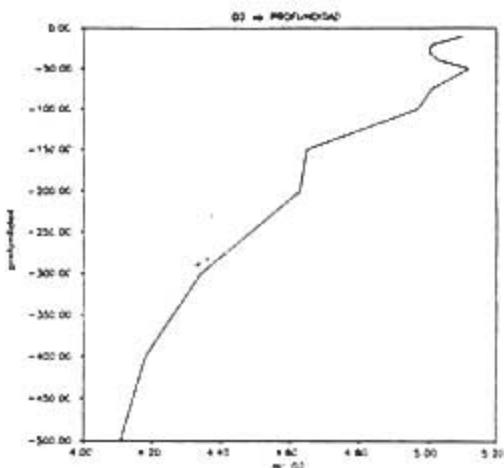


fig. 5: Perfil de oxígeno.

Aproximando los resultados a una recta se obtiene una tasa de acumulación de nitrito de :  $6.3 \cdot 10^{-3} \mu\text{mol l}^{-1} \text{min}^{-1}$ . Muestreado cada 15 min. durante 3 horas.

Las experiencias en los tanques 2 y 3 son más reveladoras  
Tanque n°2: 1000 l. Biomasa de peces 10.635 kg. Peso medio 56.5 g. Sin alimentar. Circuito de agua cerrado. Sin aireación. Se obtiene una tasa de acumulación de nitrito de  $2.17 \cdot 10^{-3} \mu\text{mol dm}^{-3} \text{min}^{-1}$  y referido a biomasa resulta  $2.54 \cdot 10^{-4} \mu\text{mol dm}^{-3} \text{min}^{-1} \text{kg}^{-1}$ . Muestreado cada 10 min. durante 2 horas.

Tanque n°3: 1000 l. Biomasa de peces 8.270 kg. Peso medio 69.5 g. Sin alimentar. Circuito de agua cerrado y sin aireación. Se obtiene una tasa de acumulación de  $:3.4 \cdot 10^{-3} \mu\text{mol dm}^{-3} \text{min}^{-1}$  que referido a la biomasa hace un valor de  $4.1 \cdot 10^{-4} \mu\text{mol dm}^{-3} \text{min}^{-1} \text{kg}^{-1}$ . Muestreado cada 10 min. durante 2 horas.

Nota: Todas las medidas se realizaron entre las 10 y las 15 horas.

## BIBLIOGRAFIA:

- Bendachemidov, E. and Bobrinov, A., 1952. A new spectrophotometric method for the determination of nitrite in seawater. *Voprosy Biologii*, 11: 87-90.
- Boyd, E.C., 1982. Water quality. In: *Water quality management for pond fish culture. Developments in aquaculture and fisheries science series*, vol. 9. Elsevier Scientific Publishing Company, New York.
- Ladrón, A.E. y Brana, J.G., 1973. Ciclo anual de la producción primaria y su relación con los nutrientes en aguas caribeñas. *Boletín del Instituto Español de Oceanografía*, no. 167, Subsecretaría de la Marina Mercante, Madrid.
- Carpenter, E.J. and Capone, G.D., 1983. (Eds.) Nitrogen in the marine environment. Academic Press, New York. 900 p.
- Gorstide, G., 1982. A chemiluminescent technique for the determination of nanomolar concentrations of nitrate and nitrite in seawater. *Anal.Chim.*, 11: 159-167.
- Goren, E. and Barmanas, P., 1985. Nitrification in rotating disk systems. I. Criteria for transition from oxygen to ammonia rate limitation. *Wat. Res.*, 19(9): 1119-1127.
- Grasshoff, K., Ehrhardt, M. and Kremling, K., 1983. Ed. *Methods of Seawater Analysis*. Verlag Chemie, Weinheim, 419p.
- Rosen, S.P. and Grasshoff, K., 1983. Procedures for the automated determination of seawater constituents. In: K.Grasshoff, M.Ehrhardt and K.Kremling (Editor), *Methods of Seawater Analysis*, Verlag Chemie, Weinheim, pp. 362-376.
- Gobat, C. and Renucci, T., 1980. A high sensitivity method for the determination of nanometer concentrations of nitrate and nitrite in seawater with a Technicon Autoanalyser II. *Anal.Chim.*, 24: 239-252.
- Pouliquen, P. and Petit, J., 1980. Practical basis of nitrification in aquaculture waste-water. In: *Aquaculture: A biotechnology in progress*. B. De Pauw, E. Allegaert, H. Achterbos and B. Wilkins (Eds.). European Aquaculture Society, Bredene.
- Technicon Industrial Systems, 1973. Nitrite in water and seawater. Ind. Method no 161-710. Technicon Corp., New York.
- MacCabe, B.F., 1985. Inorganic nitrogen in the water. In: *Chemical Oceanography*, vol.2, J.P. Riley and G. Skirrow (Eds.)
- Mode, E. and Bitterl, A., 1991. Nitrogen in the sea: forms, abundance and fate processes. CRC Press, Boca Raton. 206 p.