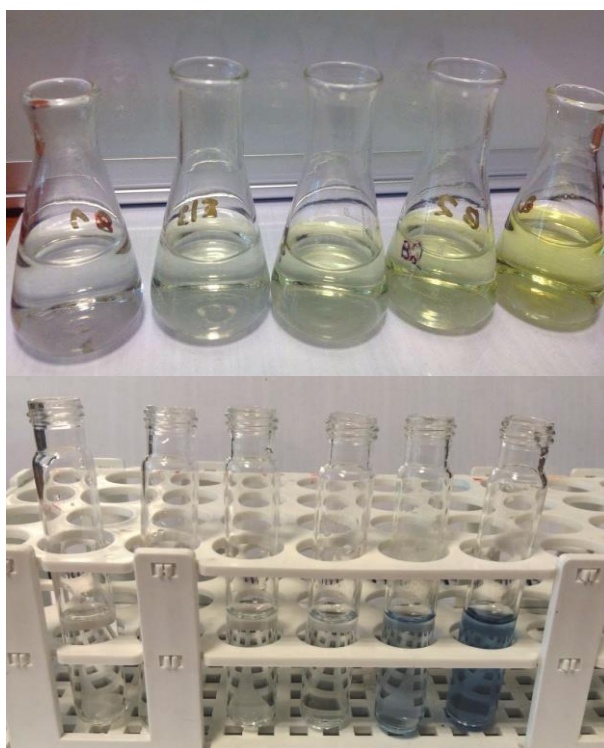


Procedimientos para la determinación de Nutrientes en en muestras de agua y sedimentos



Ecología y Rehabilitación de Sistemas Acuáticos - CURE / UDELAR

Compilado, revisado y complementado por Claudia Fosalba, Franco Teixeira de Mello, Guillermo Goyenola, Virginia Fleitas. Versión 29/08/2022

NITRÓGENO Y FÓSFORO TOTAL

FUNDAMENTO

El siguiente método está basado en la oxidación simultánea de la mayor parte de los compuestos nitrogenados y fosforados (Valderrama, 1981). Luego se analizan los compuestos de nitrógeno oxidados en forma nitrato y los de fósforo en forma fosfato (ver protocolos específicos).

CONSERVACIÓN DE LA MUESTRA

La muestra se conserva congelada **sin adición** de ningún reactivo, llevándola a temperatura ambiente para realizar la determinación.

Procedimiento para muestras de AGUA:

- Colocar 20 mL de muestra filtrada por GF/C (total disuelto) o sin filtrar (total) en frasco autoclavable con tapa rosca.
- Agregar 4 mL de reactivo oxidante.
- Autoclavar durante 30 minutos a 121 °C.

Procedimiento para muestras de SEDIMENTO:

- Homogenizar y eliminar el exceso de agua utilizando un copo 50 µm o similar.
- Pesar entre 0,2 y 0,01 g de sedimentos húmedos. Agregar 40 mL de agua ultrapura (Milli Q, Nanopure o equivalente).
- Agregar 1 g de persulfato de potasio.
- Agregar 8 mL de reactivo oxidante.
- Autoclavar durante 1 hora a 121 °C.
- Determinar gravimétricamente el peso seco de otra muestra de sedimento (estufa 100 °C hasta peso constante), de forma de expresar los resultados en función de peso seco de sedimento.

Fraccionar la muestra para la determinación de fósforo y nitrógeno de acuerdo con los procedimientos descritos para **nitrato y fosfato**.

Luego de agregar el reactivo oxidante la muestra puede conservarse hasta 70 días en la oscuridad.

REACTIVOS

Reactivo oxidante: disolver 50 g de persulfato de potasio (libre de nitrógeno) y 30 g de ácido bórico en 350 mL de hidróxido de sodio 1 M (40 g.L⁻¹). Completar hasta 1 L con agua ultrapura (Milli Q, Nanopure o equivalente). Almacenar en frasco de vidrio oscuro a temperatura ambiente y a resguardo de luz directa. Solución estable de 6 a 8 meses

FÓSFORO TOTAL Y REACTIVO SOLUBLE (FRS) U ORTOFOSFATO

La técnica más comúnmente utilizada para la determinación del FRS está basada en la formación de un complejo de fosfomolibdato en un medio ácido. Se detalla el método de Murphy & Rilley (1962).

Este procedimiento puede utilizarse para el análisis de muestras de Fósforo total ya digeridas (reactivo oxidante y autoclavado) y para muestras filtradas a las que se determinará Fosfato.

PROCEDIMIENTO

- Colocar 5,00 mL de muestra en tubo de vidrio. Utilizar la pipeta automática, cambiando de tip para cada muestra.
- Preparar blanco con agua destilada.
- Agregar 0,5 mL de reactivo mixto. **Agitar.**
- Luego de 30 minutos medir la absorbancia a 885 nm.

⚠ ¡Cuidado al trabajar con ácido sulfúrico concentrado! ⚠

- *Evitar salpicaduras.*
- *Tener en cuenta que es muy denso (las botellas son pesadas). Circular agarrando la botella con las dos manos y poniendo atención al entorno.*
- ***Nunca le des de beber a un ácido. Colocar el agua primero y luego lentamente ir agregando el ácido.***

REACTIVOS

Molibdato de amonio: disolver 7,5 g de molibdato de amonio tetrahidrato ((NH₄)₆Mo₇O₂₄·4H₂O) en 250 mL de agua destilada. Almacenar en botella de plástico en oscuridad.

Ácido Sulfúrico: agregar 140 mL de ácido sulfúrico concentrado en 900 mL de agua destilada, **agitar suavemente. Almacenar en botella de vidrio.**

Ácido ascórbico: disolver 5,4 g de ácido ascórbico en 100 mL de agua destilada. **Almacenar en botella de plástico y congelar. Antes de usar, descongelar totalmente.**

Tartrato de antimonio y potasio: disolver 0,34 g de tartrato de antimonio y potasio trihidrato ($C_8H_4K_2O_{12}Sb_2 \cdot 3H_2O$) en 250 mL de agua destilada calentando si fuera necesario. **Almacenar en heladera en botella de plástico o vidrio.**

Reactivo mixto: agregar en el siguiente orden: molibdato de amonio, ácido sulfúrico, ácido ascórbico y tartrato de antimonio y potasio, en las siguientes proporciones:

Reactivo (mL)	N° de muestras							
	10	15	20	25	30	45	50	60
Molibdato	2	3	4	5	6	9	10	12
Ác. Sulfúrico	5	7,5	10	12	15	22,5	25	30
Ác. Ascórbico	2	3	4	5	6	9	10	12
Tartrato	1	1,5	2	2,5	3	4,5	5	6

Este reactivo tiene una duración menor a 6 h a temperatura ambiente. Descartar en caso de cambio de color de amarillo a naranja.

PREPARACIÓN DE LA CURVA DE CALIBRACIÓN

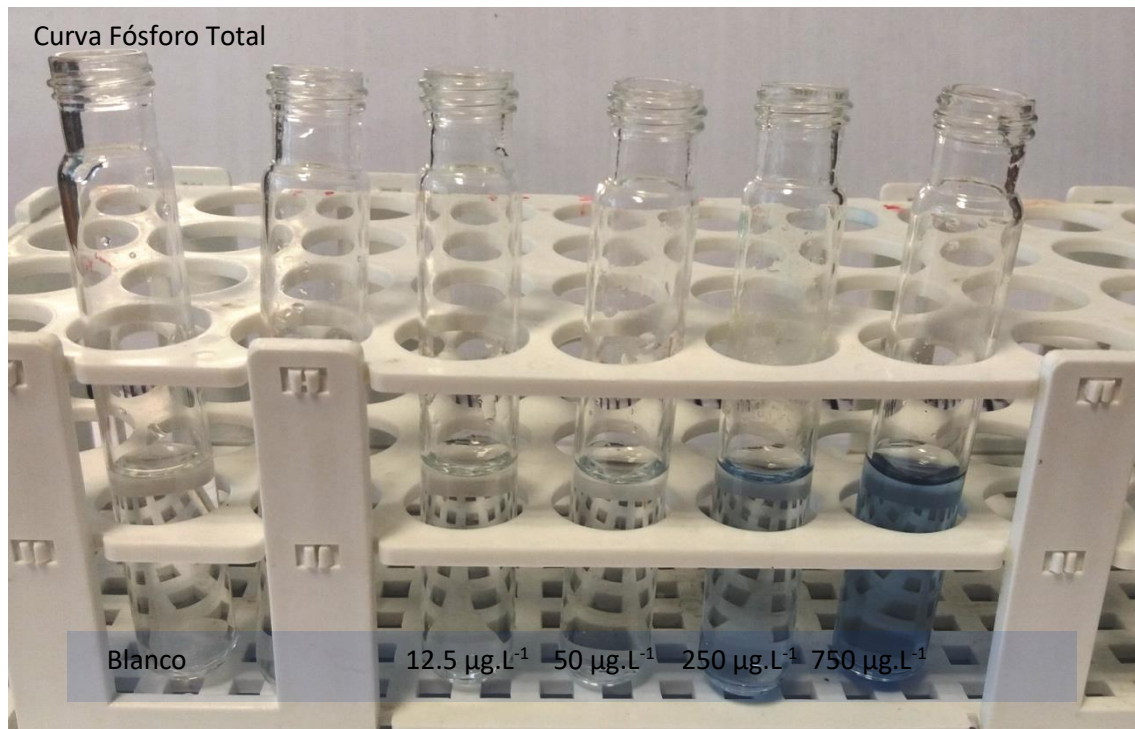
Utilizar material de vidrio aforado.

Preparar una solución stock de Fosfato: disolver 0,2195 g de KH_2PO_4 en agua ultrapura (Milli Q, Nanopure o equivalente recién producida), llevar a 1 L. Concentración final $50.000 \mu g \cdot L^{-1} PO_4^{3-}-P$.

Preparación de la solución intermedia: diluir 5 mL de la solución stock de Fosfato con agua ultrapura (Milli Q, Nanopure o equivalente) recién producida y llevar a 100 mL. Concentración final $2.500 \mu g \cdot L^{-1}$.

Con esta solución preparar una curva de calibración según la siguiente tabla:

Concentración ($\mu g PO_4^{3-}-P/L$)	Toma sol. Intermedia (mL)	Vol. final dilución (mL)
12,5	0,50	100,00
25	1,00	100,00
50	1,00	50,00
125	5,00	100,00
250	5,00	50,00
500	10,00	50,00
750	15,00	50,00



NITRÓGENO TOTAL Y NITRATOS (NO_3^-)

En presencia de salicilato de sodio, el nitrato da un compuesto de sustitución (*p*-nitrosalicilato) de color amarillo. A continuación, se describe el método de Müller & Weidemann (1955).

Este procedimiento puede utilizarse para el análisis de muestras de Nitrógeno total ya digeridas (reactivo oxidante y autoclavado) y para muestras prefiltradas a las que se determinará Nitrato.

PROCEDIMIENTO

- En un Erlenmeyer de 25 mL colocar 5,00 mL de muestra. Utilizar la pipeta automática, cambiando de tip para cada muestra.
- Preparar blanco con agua ultrapura (Milli Q, Nanopure o equivalente).
- Utilizando micropipeta automática, agregar 200 μL de solución de salicilato de sodio.
- Secar las soluciones a menos de 100 °C.
- Al residuo agregar 200 μL de ácido sulfúrico concentrado, asegurarse de mojar totalmente el residuo.
- Utilizando pipeta automática, agregar 9,1 mL de agua ultrapura (Milli Q, Nanopure o equivalente) recién producida y agitar hasta disolución total del residuo.
- Agregar 1,4 mL de solución de tartrato de sodio y potasio – hidróxido de sodio.
- Agregar 9,1 mL de agua ultrapura recién producida y agitar (volumen final 20 mL).
- Medir absorbancia de inmediato en espectrofotómetro ($\lambda = 420 \text{ nm}$).

REACTIVOS

Solución de salicilato de sodio: disolver 0,25 g de salicilato de sodio en 50 mL de agua ultrapura recién producida. **Preparar la solución para cada serie de análisis.**

Solución de tartrato de sodio y potasio – hidróxido de sodio: disolver 400 g de hidróxido de sodio en aproximadamente 600 mL de agua ultrapura recién producida. **Luego de enfriado**, agregar 50 g de tartrato de sodio y potasio y disolver. Llevar a 1000 mL con agua ultrapura recién producida.

PREPARACIÓN DE LA CURVA DE CALIBRACIÓN

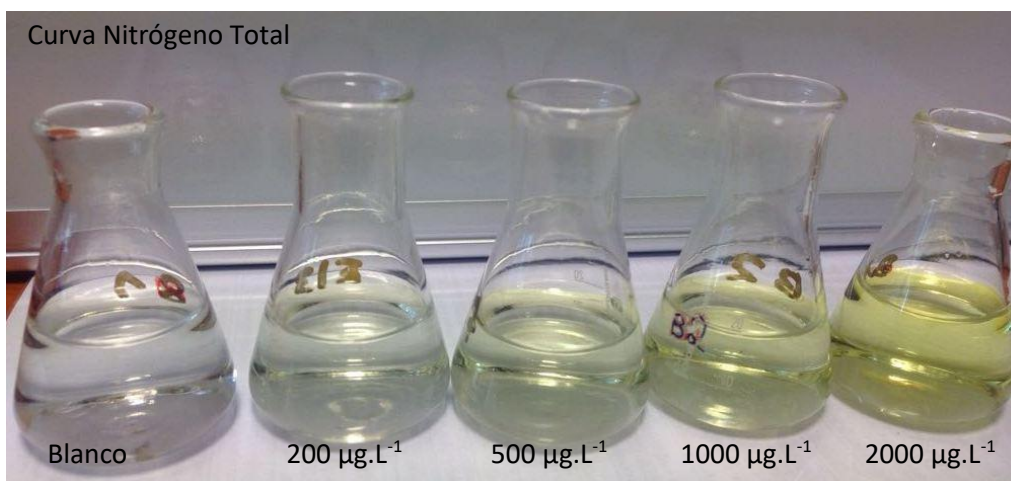
Utilizar material de vidrio aforado.

Preparar una solución stock de Nitrato: secar nitrato de potasio (KNO_3) a $105\text{ }^\circ\text{C}$ por un mínimo de 6 horas. Disolver 0,7218 g de KNO_3 en agua ultrapura recién producida, llevar a 1 L. Concentración final $100.000\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}\text{ NO}_3^- \cdot \text{N}$. Pueden agregarse 2,0 mL de CHCl_3/L como conservante. Esta solución es estable por 6 meses en heladera.

Preparación de la solución intermedia: diluir 10 mL de la solución stock de nitrato con agua ultrapura recién producida y llevar a 100 mL. Concentración final $10.000\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}\text{ NO}_3^- \cdot \text{N}$.

Con esta solución preparar una curva de calibración según la siguiente tabla:

Concentración ($\mu\text{g NO}_3^- \cdot \text{N/L}$)	Toma sol. Intermedia (mL)	Vol. final dilución (mL)
200	2,00	100,00
500	5,00	100,00
1000	10,00	100,00
2000	10,00	50,00
3000	15,00	50,00



NITRITOS

En este método el nitrito reacciona con la sulfanilamida en medio ácido. El compuesto diazo resultante reacciona con el N-(1-naftil)-etilendiamina y forma un compuesto de color fucsia intenso (azo). Se describe el método de Bedschneider & Robison (1952). Los volúmenes fueron reducidos a la mitad respecto a la técnica original (realizar en matraz de 25 mL).

PROCEDIMIENTO

- Agregar 0,5 mL de solución de sulfanilamida a 25 mL de muestra filtrada (GF/C). **Agitar.**
- Esperar entre 2 y 10 minutos y adicionar 0,5 mL de N-(1-naftil)-etilendiamina. **Agitar.**
- Luego de 10 minutos y antes de 2 horas medir la absorbancia a 543 nm.

REACTIVOS

Solución de Sulfanilamida: disolver 5 g de sulfanilamida en una mezcla de 50 mL de HCl concentrado y ca. 300 mL de agua destilada. **Solución estable por varios meses.**

Solución de N-(1-naftil)-etilendiamina: disolver 0,5 g de $C_{10}H_7NHCH_2CH_2NH_2 \cdot 2HCl$ en 500 mL de agua destilada libre de nitritos. Almacenar la solución en botella oscura y heladera, descartar si cambia de color (marrón oscuro).

PREPARACIÓN DE LA CURVA DE CALIBRACIÓN

Utilizar material de vidrio aforado.

Solución stock de Nitrito: disolver 1,232 g de $NaNO_2$ secado a 100 °C y llevar a 1 L con agua ultrapura recién producida. La solución contiene 250 $\mu g NO_2^- \cdot N \cdot mL^{-1}$.

Preparación de solución intermedia: diluir 1 mL de la solución stock de Nitrito con agua ultrapura recién producida y llevar a 500 mL. Concentración final 500,00 $\mu g \cdot L^{-1} NO_2^- \cdot N$.

Con esta solución preparar una curva de calibración según la siguiente tabla:

Concentración ($\mu g NO_2^- - N/L$)	Toma sol. Intermedia (mL)	Vol. final dilución (mL)
2,5	0,50	100,00
12,5	5,00	200,00
100	20,00	100,00
250	50,00	100,00

AMONIO

En este método la muestra es tratada con hipoclorito de sodio en un medio alcalino tamponado con citrato, utilizando nitroprusiato de sodio como catalizador. Se describe el método de azul de indofenol (Koroleff, 1970).

PROCEDIMIENTO

- **Trabajar en frascos ámbar** sin exponer las muestras a luz intensa.
- Agregar 0,3 mL de solución A a 5 mL de muestra filtrada (GF/C). **Agitar.**
- Agregar 0,3 mL de solución B. **Agitar.**
- Guardar las muestras en la oscuridad durante 1 hora (el color es estable 30 min luego de completada la reacción).
- Medir en espectrofotómetro a 630 nm.

REACTIVOS

Solución de fenol A: disolver 17,5 g de fenol (18,23 mL) y 200 mg de nitroprusiato de sodio anhidro en agua ultrapura recién producida y llevar a 500 mL. Guardar en heladera y oscuridad.

Si se usa nitroprusiato de sodio bihidrato, adicionar 227,5 mg.

Solución de hipoclorito de sodio B: disolver 140 g de citrato de sodio ($C_6H_5Na_3O_7$) y 7,5 g de NaOH en 400 mL de agua ultrapura recién producida. Agregar 17,5 mL de hipoclorito de sodio concentrado y llevar a 500 mL con agua ultrapura recién producida. Guardar en heladera y oscuridad.

Si se usa $C_6H_5Na_3O_7 \cdot 2H_2O$, adicionar 156,76 g.

PREPARACIÓN DE LA CURVA DE CALIBRACIÓN

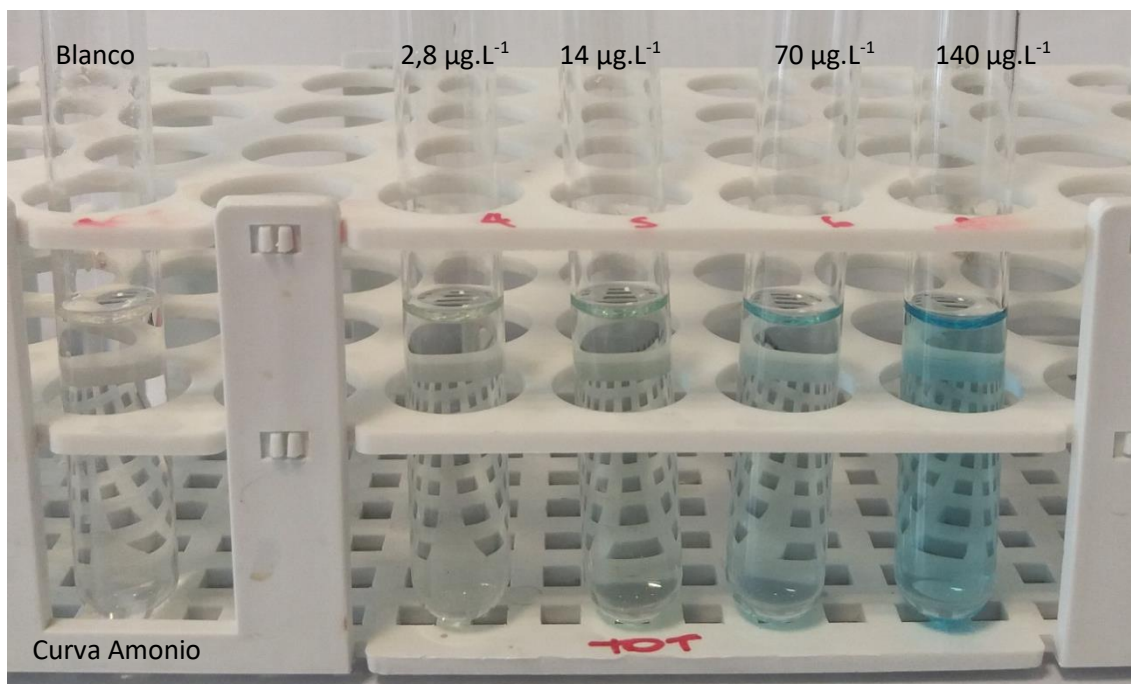
Utilizar material de vidrio aforado.

Preparar una solución stock de Amonio: disolver 0,1070 g de NH_4Cl previamente secado a 100 °C y llevar a un 1 L con agua ultrapura recién producida. La solución contiene 28 $mg \cdot L^{-1}$ de NH_4^+-N .

Preparación de solución intermedia: diluir 1 mL de la solución stock de Amonio con agua ultrapura recién producida y llevar a 100 mL. Concentración final 280 $\mu g \cdot L^{-1}$ NH_4^+-N .

Con esta solución preparar una curva de calibración según la siguiente tabla:

Concentración ($\mu\text{g NH}_4^+\text{-N/L}$)	Toma sol. Intermedia (mL)	Vol. final dilución (mL)
2,8	0,50	50,00
7	2,50	100,00
14	2,50	50,00
28	10,00	100,00
56	20,00	100,00
140	25,00	50,00
280	Solución intermedia	



DETERMINACIÓN ESPECTROFOTOMÉTRICA Y CÁLCULOS

En todos los casos proceder de la misma manera con agua ultrapura recién producida como blanco (realizar por duplicado) y los estándares diluidos (curva de calibración).

Curva de calibración: con objeto de ser utilizada a posteriori para estimar la concentración a partir de la absorbancia, ajustar la ecuación de una recta para los datos de concentración real de los estándares diluidos, en función de la absorbancia corregida (se le debe restar el promedio de los blancos). Ténganse en cuenta que un ajuste aceptable suele alcanzar $r^2 \geq 0,99$. Chequear si se mantiene la linealidad en todo el rango. Si eliminando datos de concentraciones altas se mejora el nivel de ajuste, tomar un rango de concentraciones menor.

Muestras: calcular la concentración de cada muestra a partir de la siguiente fórmula:

$$\text{Concentración} = (\text{Abs}_{\text{corregida}} \times a) + b$$

Abs_{corregida}: absorbancia de la muestra menos la del promedio de los blancos;

a: pendiente de la curva de calibración; **b:** ordenada en el origen.

Las muestras que caigan fuera de rango de la curva de calibración deberán ser repetidas realizando diluciones.

Si la muestra fue diluida, multiplicar el resultado por el factor de dilución.

IMPORTANTE

Usar material de vidrio seco pre-tratado con HCl en agua destilada (calidad mRo), último enjuague con agua ultrapura recién producida.

Si se varía el volumen de la muestra, mantener todas las proporciones de reactivos dependiendo del método.

Referencias

Bendsschneider, K. & R.J., Robinson. (1952). A new spectrophotometric method for the determination of nitrite in sea water. *J. Mar. Res.* 11:87-96.

Koroleff, F. (1970). Revised version of direct determination of ammonia of natural waters as indophenol blue. *Int. Con. Explor. Sea C.M. 1969/C9. ICES. Information on techniques and methods for sea water analysis. Interlab. Rep.* 3:19-22.

Monteiro, M. I. C., Ferreira, F. N., de Oliveira, N. M. M. & Avila, A. K. (2003). Simplified version of the sodium salicylate method for analysis of nitrate in drinking waters. *Analytica Chimica Acta* 477, 125–129.

Murphy, J. & J.P. Rilley. (1962). A modified single solution method for the determination in natural waters. *Analyt. Chim. Acta* 27:31-36.

Valderrama, J. C. (1981). The simultaneous analysis of total Nitrogen and total Phosphorus in natural waters. *Mar. Chem.* 10:109-122