



Guía básica

**Determinación de la calidad del agua
en acuarios marinos**

Edén Magaña Gallegos

**UNAM-DGAPA
PAPIME PE207521**

Guía básica:

**Determinación de la calidad del agua en
acuarios marinos**

Universidad Nacional Autónoma de México

2023

Contenido

Introducción general	1
Técnicas de monitoreo de la calidad del agua en acuarios	4
Frecuencia de muestreo	4
Técnicas de monitoreo <i>in-situ</i>	5
Temperatura.....	5
Salinidad.....	6
pH	8
Oxígeno disuelto.....	9
Nutrientes, alcalinidad, calcio y magnesio	11
Técnicas de monitoreo <i>ex-situ</i>	14
Recomendaciones generales para los usuarios	14
Filtración y almacenamiento de las muestras	14
Determinación de amonio ($\text{NH}_3 + \text{NH}_4$)	16
Determinación de nitrito (NO_2)	25
Determinación de nitrato (NO_3)	33
Determinación de fosfato (PO_4)	41
Determinación de la dureza total, calcio y magnesio	48
Determinación de la alcalinidad total	54

Introducción general

A lo largo de la historia, se ha encontrado que el agua en la naturaleza puede variar en sus cualidades, afectando su uso en las diferentes industrias. Por lo anterior, se acuña el término “calidad del agua”, el cual se define como cualquier característica física, química o biológica que influye en un propósito particular (Boyd, 2019). Entonces, en el cultivo de organismos acuáticos la calidad del agua se puede definir como: todos aquellos atributos físicos, químicos y biológicos que afectan el cultivo de un organismo acuático específico (Boyd, 1990). De la definición anterior se debe entender entonces que “la biología de la especie” es una parte fundamental que hay que tomar en cuenta cuando se intenta definir lo que es la calidad del agua en un acuario. Es decir, la calidad del agua no será la misma para peces, crustáceos o corales, e incluso dentro de estos grandes grupos las variables más importantes relacionadas con la calidad del agua pueden variar.

Determinar y mantener la calidad del agua de los acuarios no es una tarea sencilla. Esto se debe a que hay que medir las variables fisicoquímicas de interés y si fuese necesario, llevar a cabo acciones para corregirla. Dentro de las principales variables podemos encontrar a la temperatura, salinidad, pH, oxígeno disuelto, nutrientes, alcalinidad, calcio y magnesio (Tabla 1). Estas variables deben ser medidas de manera rutinaria en los acuarios, ya sean estos abiertos o cerrados, con el fin de mantenerlas en los rangos aceptables para el cultivo de los organismos acuáticos de interés. En la Tabla 1 se delinean las principales variables fisicoquímicas para cuatro grupos de organismos cultivados en acuarios, tanques y/o estanques, y puede servir de guía para su mantenimiento por largos periodos de tiempo. Por lo anterior, el objetivo del presente documento es ofrecer al lector (investigadores, estudiantes y público en general) una guía de las principales variables medidas en acuarios marinos.

Tabla 1. Principales variables de la calidad del agua para el cultivo de organismos acuáticos en acuarios marinos. Los valores mostrados son válidos cuando se utiliza agua de mar a una salinidad de 35 – 36. ND = no determinado.

Parámetro	Corales¹ <i>Acropora palmata</i>	Pastos marinos^{2,3} <i>Thalassia testudinum</i> <i>Syringodium filiforme</i> <i>Halodule wrightii</i>	Langosta⁴ <i>Panulirus argus</i>	Camarones peneidos^{5,6} <i>Penaeus vannamei</i> <i>Penaeus brasiliensis</i>
Temperatura (°C)	26 – 28	25 – 28 °C	28 – 29	27 – 29
Salinidad	35	24 - 35	35 – 37	0 - 35
Oxígeno disuelto (mg/l)	> 4	ND	> 4	> 4 – 5
pH	8.1 – 8.3	8.0 – 8.3	8.0 – 8.2	> 7.5 – 8.0
Sólidos sedimentables totales (ml/l)	ND	ND	ND	< 15
Amonio* (mg/l)	< 0.01	< 0.05	< 1	< 1
Nitrito (mg NO₂/l)	<0.1	ND	< 5	< 5 - 25
Nitrato (mg NO₃/l)	<0.5	1 – 5	< 100	< 150
Fosfato (mg PO₄/l)	< 0.03	0.095	ND	< 0.3
Potencial redox (mV)	250 – 400	ND	ND	< 500
Alcalinidad (mg CaCO₃/l)	125 – 160	125 – 160	200	140
Dureza (mg CaCO₃/l)	ND	ND	ND	150
Calcio (mg Ca²⁺/l)	380 – 440	300 – 400	400	400
Magnesio (mg Mg²⁺/l)	1250 – 1350	ND	1300	1300

*NAT: Nitrógeno amoniacal total; se refiere a la sumatoria del amonio no-ionizado (NH₃) y el amonio ionizado (NH₄).

**ND: no determinado.

¹ (Schubert et al. 2017); ² (Tussenbroek et al. 2006); ³ (Lardizabal, 2006); ⁴ (Supriyono et al. 2022); ⁵ (Rode, 2014); ⁶ (Boyd, 2002)

Referencias

- Boyd, C. E. (1990). *Water quality in ponds for aquaculture*. Birmingham Publishing Co., Birmingham, AL, USA.
- Boyd, C. E. (2002). Dissolved salts in water for inland, low-salinity shrimp culture—Responsible Seafood Advocate. Global Seafood Alliance. <https://www.globalseafood.org/advocate/dissolved-salts-in-water-for-inland-low-salinity-shrimp-culture/>
- Boyd, C. E. (2019). *Water quality: An introduction*. Springer Nature. Cham, Switzerland.
- Lardizabal, S. (2006). Beyond the refugium: Seagrass aquaria by Sarah Lardizabal—Reefkeeping.com. Reefkeeping. <https://reefkeeping.com/issues/2006-04/sl/index.php>
- Rode, R. (2014). *Marine shrimp biofloc systems: Basic management practices*. Purdue University, forestry, and natural resources.
- Schubert, P., Wilke, T., Schubert, P., & Wilke, T. (2017). Coral microcosms: Challenges and opportunities for global change biology. En *Corals in a Changing World*. IntechOpen.
- Supriyono, E., Soelistyowati, D. T., Adiyana, K., & Thesiana, L. (2022). The effects of alkalinity on production performance and biochemical responses of spiny lobster *Panulirus homarus* reared in recirculating aquaculture system. *Israeli Journal of Aquaculture-Bamidgeh*, 74, 1-14.
- Tussenbroek, B. I. van., Vonk, J. A., Stapel, J., Erfteimeijer, P. L. A., Middelburg, J. J., & Zieman, J. C. (2006). The Biology of Thalassia: Paradigms and Recent Advances in Research. En A. W. D. Larkum, R. J. ORTH, & C. M. Duarte (Eds.), *Seagrasses: Biology, ecology, and conservation* (pp. 409-439). Springer Netherlands.

Técnicas de monitoreo de la calidad del agua en acuarios

En general, la calidad del agua puede ser determinada de dos maneras. Ya sea directamente en el acuario (*in-situ*) o colectando muestras de agua y analizándolas en laboratorio (*ex-situ*). La elección de la técnica más adecuada se elige por el usuario, los objetivos del acuario (investigación, recreativo, mantenimiento) y de los equipos con los que se cuente. A continuación, se describen las técnicas usadas para determinar las principales variables de la calidad del agua en los acuarios de manera *in-situ* y *ex-situ*.

Frecuencia de muestreo

La frecuencia de muestreo se refiere a la cantidad de muestras que se requieren analizar en periodos definidos. El definir un periodo de tiempo estará relacionado con la factibilidad del procesamiento de la muestra, la capacidad de almacenamiento y los objetivos del acuario. En la Tabla 2, se provee información general de la frecuencia de muestreo de las variables de la calidad del agua en los acuarios.

Tabla 2. Frecuencia de muestreo de las principales variables fisicoquímicas de los acuarios.

Parámetro	Frecuencia de la prueba
Temperatura (°C)	Dos veces al día
Salinidad	Una vez al día
Oxígeno disuelto (mg/l)	3 a 5 veces al día. En ocasiones determinaciones nocturnas.
pH	Dos veces al día
Amonio (mg/l)	1 vez cada tercer día
Nitrito (mg/l)	1 vez cada tercer día
Nitrato (mg/l)	1 vez cada tercer día
Alcalinidad (mg CaCO ₃ /l)	1 vez por semana
Calcio (mg/l)	1 vez por semana
Magnesio (mg/l)	1 vez por semana
Dureza (mg CaCO ₃ /l)	1 vez por semana

Técnicas de monitoreo *in-situ*

Temperatura

La temperatura del agua es una medida de su contenido de energía térmica interna (Boyd, 2019). Y sus principales unidades de medida son los grados Celsius ($^{\circ}\text{C}$) y los grados Fahrenheit ($^{\circ}\text{F}$). Esta variable es una de las más importantes de la calidad del agua, ya que afecta tanto la química del agua, así como las funciones de los organismos acuáticos (Lucas et al. 2019). Muchos organismos acuáticos como peces, crustáceos y corales son poiquiloterms (es decir, su temperatura corporal es muy similar a la del agua que lo rodea). Es por esto, que aumentos o disminuciones significativas en la temperatura pueden tener un efecto en la fisiología de los organismos (Lucas et al. 2019). Uno de los efectos más notorios en acuarios es el blanqueamiento de los corales provocado por la exposición prolongada a altas temperaturas. La temperatura del agua estará relacionada con la radiación solar y la temperatura del aire, así como algunos equipos que frecuentemente son utilizados en los acuarios y que debido a su trabajo emiten energía al agua, incrementando su temperatura (p. ej. Bombas de agua y lámparas).

Afortunadamente, la temperatura puede ser monitoreada en los acuarios a través de varios equipos. El termómetro es el equipo más utilizado para medir la temperatura debido a que es muy económico, fácil de ocupar e incluso puede ser colocado dentro del acuario por tiempo indefinido (Fig. 1). El principio utilizado de este equipo para medir la temperatura es la expansión de ciertas sustancias (p. ej. Alcohol) dentro de un tubo fino capilar, donde la sustancia subirá o descenderá dependiendo de la temperatura del medio (Lekang, 2007). La posición superior de la sustancia marcará la temperatura con ayuda de una escala previamente calibrada. Otro equipo que podemos ocupar son los sensores de temperatura. Estos pueden ser utilizados de manera individual o pueden ser integrados a equipos multiparamétricos (Fig. 1). La desventaja de estos equipos es que generalmente son costosos. Sin embargo, son muy precisos al determinar la temperatura. Estos equipos funcionan midiendo la resistencia eléctrica de un material (Lekang, 2007). Por lo tanto, estos equipos miden la corriente eléctrica que fluye a través de un circuito del cual este material es parte fundamental, y donde su valor será proporcional a la temperatura del agua (Lekang, 2007).



Figura 1. Principales equipos utilizados para la determinación de la temperatura en el agua de acuarios. A) Termómetro comercial. B) termómetro digital comercial. C) Multiparamétrico con sensor de temperatura.

El número de veces y las zonas de muestreo para determinar la temperatura en los acuarios dependerá de los objetivos del acuario y/o el tamaño de los acuarios. Entonces, cuando los acuarios sean muy grandes, será preferible medir la temperatura en varias zonas. Además, si el acuario es muy profundo (> 1 m) se recomienda medir la temperatura a diferentes profundidades. De manera general se recomienda medir la temperatura al menos dos o tres veces al día (Tabla 2).

Salinidad

La salinidad se refiere a la concentración total de todos los iones en el agua (Boyd, 2019; Van Wyk et al. 1999). La salinidad del agua de mar típicamente varía entre 28 y 35 partes por mil (ppt) que es lo mismo que gramos por litro (g/l) (Boyd, 1990). La salinidad es una variable muy importante para los organismos acuáticos, ya que muchos de ellos tendrán rangos de tolerancia que se deben mantener con el fin de que puedan llevar a cabo sus procesos metabólicos (Lucas et al. 2019). Entre más estrecho o amplio sea este rango, los organismos serán clasificados como estenohalinos o eurihalinos respectivamente. Por lo que definir previamente su tolerancia a la salinidad ayudará a mantener a los organismos acuáticos por más tiempo. Hay que recordar que la salinidad afectará la osmorregulación de los organismos y, por lo tanto, salirnos de los rangos óptimos de cultivo provocará que gasten mucha energía para mantener su balance iónico a expensas de crecer y llevar a cabo otros procesos (Lucas et al. 2019). Eventualmente, si los organismos son sometidos a salinidades

fuera de sus límites de tolerancia, empezarán a mostrar efectos subletales o letales (Lucas et al. 2019).

En el mercado existen varias opciones para determinar la salinidad del agua. Se puede utilizar un hidrómetro el cual mide la salinidad basada en la densidad específica del agua (Fig. 2) (Van Wyk et al. 1999). Y como la densidad del agua aumenta con el incremento de la salinidad, es posible utilizar la flotabilidad de ciertos objetos para medir la salinidad. La ventaja de estos equipos es que son muy económicos, pero en contraparte no tienen una muy buena capacidad para detectar ligeros cambios en la salinidad del agua. Otro equipo que podemos ocupar para medir la salinidad son los refractómetros, los cuales se basan en el índice refractivo del agua (a mayor salinidad mayor será el índice refractivo) (Fig. 2). De manera general, los refractómetros determinan la salinidad mostrando el ángulo refractado de la luz sobre una escala. El usuario entonces verá una zona iluminada y una zona azul, con un borde horizontal entre estas dos zonas, indicando la salinidad del agua. Estos equipos son económicos y fáciles de ocupar, además de que son fáciles de transportar (Van Wyk et al. 1999). Sin embargo, al igual que los hidrómetros, no detectan bien cambios ligeros en la salinidad. Finalmente, también es posible utilizar sensores de conductividad para medir la salinidad (Fig. 2). Estos equipos miden la resistencia del agua al flujo eléctrico, el cual es inversamente proporcional a la salinidad. Conforme la salinidad disminuye, la resistencia del flujo eléctrico disminuye. Generalmente, estos sensores tienen acoplado un sensor de temperatura con el fin de corregir el valor de la conductividad medida (Lekang, 2007). La principal desventaja de los sensores de salinidad es que son costosos y deben ser calibrados periódicamente para asegurar la calidad del valor obtenido. Mientras que su principal ventaja es que pueden ser utilizados rápidamente y tienen una alta precisión.

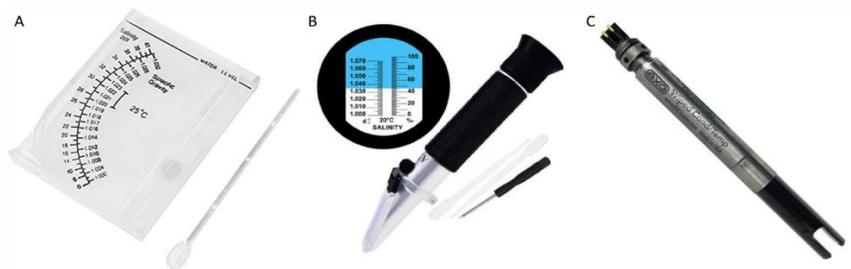


Figura 2. Principales equipos usados para la determinación de la salinidad del agua en acuarios. A) Hidrómetro. B) refractómetro. C) Sensor de salinidad/temperatura.

Al igual que con la temperatura, el número de veces y los sitios de muestreo para determinar la salinidad en los acuarios dependerá de los objetivos del acuario y/o el tamaño de estos. Los acuarios pequeños (< 150 litros) tendrán fluctuaciones de salinidad más grandes que acuarios grandes. Se recomienda medir la salinidad al menos una vez al día (Tabla 2).

pH

El pH es definido como el logaritmo negativo de la concentración de iones hidrógeno (Boyd, 1990). El uso del logaritmo negativo fue recomendado por el químico S.P.L. Sørensen en el año 1900, con el fin de evitar usar valores muy pequeños de concentraciones molares cuando nos referíamos a la concentración del ion H^+ (Boyd, 2019). Y entonces el logaritmo negativo de la concentración de iones hidrógeno fue llamado pH (Boyd, 2019). La escala del pH generalmente va de 0 a 14, con un pH de 7 correspondiendo a un valor neutro (Ebeling y Timmons, 2010). En los acuarios marinos es muy común encontrar valores de pH de entre 7.8 – 8.2. Esta variable tendrá un efecto muy marcado en la disociación del amonio, el cual puede llegar a ser tóxico para los organismos acuáticos (Ebeling y Timmons, 2010). Además, el pH podrá fluctuar en los acuarios dependiendo de la cantidad de respiración y fotosíntesis que esté ocurriendo en determinado momento (Boyd, 2019; Van Wyk et al. 1999). Por lo que, para evitar cambios bruscos en el pH del agua, será muy importante que la capacidad buffer del agua (alcalinidad) esté en niveles óptimos (Van Wyk et al. 1999). En camarones, por ejemplo, cambios bruscos en el pH pueden estresarlos y causar que su exoesqueleto sea blando, disminuyendo su supervivencia (Carbajal-Hernández et al. 2013).

Para medir el pH existen varios equipos que pueden ser utilizados (Fig. 3). El método más simple es utilizar tiras reactivas (papel tornasol) que tienen un indicador que al entrar en contacto con el agua cambian de color (Lekang, 2007; Van Wyk et al. 1999). Este color resultante puede ser comparado con la escala de color que proporciona el fabricante y entonces se puede conocer el pH del agua. Estas tiras reactivas son muy económicas y fáciles de usar, pero su interpretación puede estar sujeta a la observación del usuario. También es posible utilizar kits colorimétricos comerciales (Fig. 3), pero de igual manera su interpretación puede ser subjetiva. Un método más preciso es utilizar un medidor de pH (Fig. 3) (Lekang, 2007). Este equipo cuenta con dos electrodos, uno para medir la concentración de iones hidrógeno y otro sirve como un electrodo de referencia. Este equipo cuenta con una

membrana permeable a los iones hidrógeno. Entonces, entre los electrodos pasará una corriente que dependerá de la concentración de iones hidrógeno. El voltaje entre ambos electrodos será medido y el pH será calculado (Lekang, 2007). La desventaja de este último equipo es que son algo costosos y requieren un mantenimiento constante. Aunque, en contraparte, su uso puede ser muy prolongado y se puede ocupar para medir el pH múltiples veces.



Figura 3. Principales equipos usados para la determinación del pH del agua en acuarios. A) Papel tornasol o papel pH. B) Kit comercial colorimétrico. C) Medidor de pH/temperatura.

El pH debe ser monitoreado constantemente en los acuarios y la recomendación es que se mida dos veces al día, una vez por la mañana y otra por la tarde-noche (Tabla 2), con el fin de detectar cambios bruscos y poder llevar a cabo acciones para estabilizarlo.

Oxígeno disuelto

La atmósfera está comprendida por varios gases, entre ellos el oxígeno (O_2). Este gas comprende el 21% de todos los gases presentes en el aire. En la atmósfera, el oxígeno ejerce una presión parcial en el agua [$P_{O_2} = (760) (0.2095) = 159.2$ mm], lo que provoca que el oxígeno tienda a entrar al agua y disolverse (Boyd, 1990). A este oxígeno que entró y se disolvió se le conoce como oxígeno disuelto y su concentración se expresa en miligramos de oxígeno disuelto por litro (mg OD/l) (Van Wyk et al. 1999). La solubilidad del oxígeno estará también influenciada por la elevación, salinidad y temperatura, y conforme cualquiera de estas variables aumente, la solubilidad del oxígeno disminuirá (Van Wyk et al. 1999). Además, las concentraciones de oxígeno variarán dependiendo de la productividad primaria

en el tanque y la respiración (Van Wyk et al. 1999). En los organismos acuáticos, la respiración se lleva a cabo en las branquias. En las branquias, la tensión del oxígeno es mayor que en la sangre, y entonces el oxígeno es cargado en la hemoglobina (Lucas et al. 2019). De ahí, el oxígeno es transportado hacia los diferentes tejidos de los organismos. En invertebrados, no hay hemoglobina, pero hay otro pigmento conocido como hemocianina, que es la encargada de transportar el oxígeno hacia los tejidos (Lucas et al. 2019). De manera general, la concentración de oxígeno disuelto para la mayoría de los organismos de cultivo se encuentra por encima de 4 – 5 mg OD/l (Carbajal-Hernández et al. 2013).

La determinación del oxígeno se puede llevar a cabo por titulación a través del método de Winkler (Ebeling y Timmons, 2010). Sin embargo, este método tiene varias desventajas, tales como ser de lenta ejecución y requerir personal capacitado (Ebeling y Timmons, 2010). Al ser esta técnica de lenta ejecución, las acciones que se pueden llevar a cabo para corregir algún problema relacionado con el oxígeno en un acuario pueden llegar muy tarde y entonces ser catastróficas para la sobrevivencia de los organismos. Entonces, el método más rápido y sencillo para la determinación del oxígeno disuelto es usar un oxímetro, el cual tiene una sonda especial para determinar el oxígeno disuelto (Fig. 4) (Lekang, 2007).



Figura 4. Oxímetro comercial para la determinación del oxígeno disuelto en acuarios.

Las sondas de oxígeno disuelto tienen un conductor cargado positivamente (ánodo) y un conductor cargado negativamente (cátodo). Estos conductores están protegidos en una pequeña cámara que contiene un electrolito y los separa del agua del acuario a través de una membrana permeable a las moléculas de oxígeno. Dentro de esta cámara se llevará a cabo el proceso de electrólisis y los electrones pasarán a través de los electrodos (Lekang, 2007). La magnitud del transporte de electrones será afectada por la cantidad de oxígeno en el electrolito y, por lo tanto, estará relacionada con la cantidad de oxígeno en el agua. Actualmente, muchos de estos equipos ya incluyen algoritmos que les permiten compensar la altitud, temperatura y salinidad. Este tipo de instrumentos son muy sencillos de usar, pero requieren de cuidado y mantenimiento constante. El costo de estos equipos puede ser bastante elevado.

La frecuencia de determinación del oxígeno disuelto dependerá de varios factores tales como: la productividad en el acuario, la densidad de siembra de los organismos, la cantidad de alimento que se provea y la respiración proveniente de los organismos de cultivo, bacterias y otros organismos en la columna de agua. Por esta razón, el oxígeno debe ser monitoreado tanto durante el día como la noche (Tabla 2). En camaronicultura, se recomienda que durante el día se tomen en intervalos de cada tres a cuatro horas, mientras que durante la noche la frecuencia puede aumentar a cada dos o tres horas. En acuarios pequeños que cuenta con espumadores, piedras aireadoras y agitación constante del agua por diversos equipos, la determinación del oxígeno disuelto puede resumirse a un par de veces durante el día.

Nutrientes, alcalinidad, calcio y magnesio

Los nutrientes como el amonio ($\text{TAN} = \text{NH}_3 + \text{NH}_4$), nitrito (NO_2), nitrato (NO_3) y fosfato (PO_4), así como la alcalinidad, calcio (Ca^{2+}) y magnesio (Mg^{2+}) pueden ser determinados con kits colorimétricos comerciales. Estos kits se ocupan en los acuarios e incluso granjas de cultivo, ya que permiten tomar decisiones de manera rápida basadas en determinaciones confiables (Bartlett, 2013; Naigaga et al. 2017). Como resultado, los kits comerciales se han vuelto muy populares para medir la calidad del agua. Basta con seguir las instrucciones de cada fabricante para determinar la variable de la calidad del agua que se desee conocer (Fig. 5) (Bartlett, 2013).

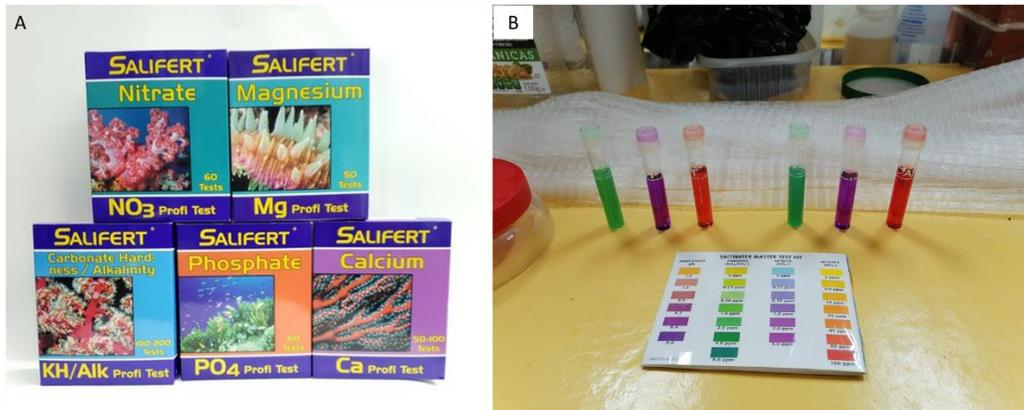


Figura 5. Kits colorimétricos utilizados con frecuencia en los acuarios. A) Kits de la marca Salifert, una de las marcas más reconocidas en acuarios. B) Escala de los kits y color desarrollado de las muestras.

Estos kits también han sido reportados en artículos científicos con el fin de proveer información sobre las variables fisicoquímicas en las que mantenían a sus organismos. No obstante, deben ser evitadas cuando determinaciones más precisas sean necesarias o el factor a probar sea una variable de la calidad del agua específica (Naigaga et al. 2017). Cuando esto sea necesario, será preferible utilizar técnicas analíticas espectrofotométricas. El objetivo de esta sección es dar a conocer la utilidad de estos kits y no detallar cada uno de ellos, ya que la cantidad de marcas existentes en el mercado es bastante grande y los pasos a seguir varían dependiendo de la marca. En la siguiente sección se abordarán los métodos analíticos para determinar las variables más importantes de la calidad del agua.

Referencias

- Bartlett, T. C. (2013). Small scale experimental systems for coral research: Considerations, planning, and recommendations. NOAA Tech. Memo. NOS NCCOS 165. CRCP 18 68.
- Boyd, C. E. (1990). Water quality in ponds for aquaculture. Birmingham Publishing Co., Birmingham, AL, USA.
- Boyd, C. E. (2019). Water quality: An introduction. Springer Nature. Cham, Switzerland.
- Carbajal-Hernández, J. J., Sánchez-Fernández, L. P., Villa-Vargas, L. A., Carrasco-Ochoa, J. A., & Martínez-Trinidad, J. F. (2013). Water quality assessment in shrimp culture using an analytical hierarchical process. *Ecological indicators*, 29(2013), 148-158.
- Ebeling, J. M., & Timmons, M. B. (2010). Recirculating aquaculture. Cayuga Aqua Ventures Ithaca, NY.
- Lekang, O.I. (2007). Aquaculture engineering. Wiley Online Library. West Sussex, UK.
- Lucas, J. S., Southgate, P. C., & Tucker, C. S. (2019). Aquaculture: Farming aquatic animals and plants. John Wiley & Sons.
- Naigaga, S., Boyd, C. E., Gaillard, P., Abdelrahman, H. A., & Molnar, J. J. (2017). Assessing the reliability of water-test kits for use in pond aquaculture. *Journal of the World Aquaculture Society*, 48(4), 555-562.
- Van Wyk, P., Davis-Hodgkins, M., Laramore, R., Main, K. L., Mountain, J., & Scarpa, J. (1999). Farming marine shrimp in recirculating freshwater systems (Vol. 7). Harbor Branch Oceanographic Institution Ft. Pierce, FL.

Técnicas de monitoreo *ex-situ*

Recomendaciones generales para los usuarios

Seguridad:

Bata de laboratorio, zapatos cerrados, guantes. Agregar ácido al agua (nunca agua al ácido).

Limpieza del equipo:

Todo el material de vidrio debe ser lavado con un detergente especial para laboratorio (p. ej. extran®), enjuagado con agua corriente y luego con agua destilada. Posteriormente, los materiales deben ser sumergidos por al menos 30 min en una solución de ácido clorhídrico al 5% [para 1 L de solución: en un recipiente, colocar 864.8 mililitros de agua y lentamente agregar 135.2 mililitros de ácido concentrado (al 37%)] (Wilde y Radtke, 1998) o podrían sumergirse toda la noche para asegurar su limpieza. Finalmente, enjuagar los materiales con agua destilada y secar. De preferencia apartar estos materiales para ser usados solamente para la determinación de nutrientes.

Filtración y almacenamiento de las muestras

La filtración y colecta de las muestras para los análisis *ex-situ* determinarán la calidad del dato final obtenido. En general, se ha planteado que las muestras para nutrientes deben ser filtradas previamente a su procesamiento en el laboratorio. Lo más sencillo es utilizar bombas de vacío con porta filtro que nos permitan filtrar la muestra de manera rápida (Fig. 6). Otra opción, y generalmente la más elegida para la filtración de muestras de agua directamente en los acuarios es utilizar un portafiltro; son económicos y fáciles de usar (Fig. 6). También es posible utilizar centrífugas con capacidad para centrifugar tubos Falcon de 15 y 50 ml con el fin de separar el material no disuelto, y posteriormente procesar la muestra (Fig. 6).

Otro aspecto importante, es el tipo de material del recipiente elegido y el método de preservación para almacenar las muestras. Generalmente, para todos los parámetros *ex-situ* que se describen en las siguientes secciones, se recomienda utilizar contenedores de polietileno lavados con jabón libre de fosfatos (p. ej. extran®) y una solución de ácido clorhídrico al 5%. Las muestras para nutrientes pueden ser almacenadas en un congelador a -20°C por varios meses sin afectar los resultados (Dore et al. 1996). Para las muestras de alcalinidad estas pueden almacenarse en oscuridad hasta por 47 días en refrigeración a 20°C .

Las muestras de calcio, magnesio y dureza total pueden ser almacenadas hasta por 1 semana en oscuridad y refrigeración (Dore et al. 1996).

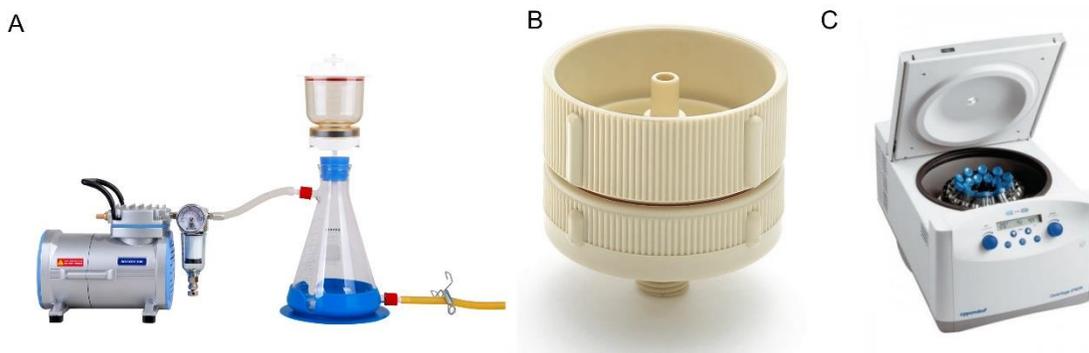


Figura 6. Equipos frecuentemente utilizados para filtrar muestras de agua. A) Bomba de vacío y porta filtro. B) adaptador de jeringa para filtro de 50 mm. C) Centrífuga con rotor para filtrar tubos Falcon.

Referencias

- Dore, J. E., Houlihan, T., Hebel, D. V., Tien, G., Tupas, L., & Karl, D. M. (1996). Freezing as a method of sample preservation for the analysis of dissolved inorganic nutrients in seawater. *Marine Chemistry*, 53(3-4), 173-185.
- Wilde, F. D., & Radtke, D. B. (1998). *Handbooks for Water-resources Investigations: National field manual for the collection of water-quality data. Field measurements.* U.S. Department of the Interior, U.S. Geological Survey.

Determinación de amonio ($NH_3 + NH_4$)

La presente técnica para la determinación del nitrógeno amoniacal total (TAN = $NH_3 + NH_4$) está basada en el protocolo de Solorzano, (1969) y Strickland y Parsons, (1972) para espectrofotómetro. Este método se basa en el uso de fenol-hipoclorito con nitroprusiato como catalizador. Brevemente, el amonio reacciona con el fenol e hipoclorito bajo condiciones alcalinas para formar el azul de indofenol. El desarrollo de este color será proporcional a la concentración de amonio dentro un rango dado (Wetzel y Likens, 2000). Todas las técnicas utilizadas para la determinación del amonio miden el nitrógeno amoniacal total (TAN), el cual es la sumatoria del amonio ionizado (NH_4) y el amonio no ionizado (NH_3) (Grasshoff et al. 2009). La determinación del amonio con este método es adecuada tanto para agua dulce, estuarina y marina (Zadorojny et al. 1973). Solamente si las aguas contienen ácido sulfhídrico (H_2S) será necesario llevar a cabo un pretratamiento de la muestra (Zadorojny et al. 1973) (ver Anexo I al final de este protocolo). El amonio no ionizado puede ser tóxico para organismos acuáticos tales como peces, crustáceos, moluscos, corales, etc. Una vez determinado el TAN, es posible calcular la fracción de NH_4 y NH_3 si los valores de temperatura, presión, salinidad y pH son conocidos (Zadorojny et al. 1973; ver Anexo II al final de este protocolo).

Rango de determinación, diluciones y filtración

- Para celdas de 10 cm (100 mm): 0.0013 a 0.13 mg/l NH_4 (es decir, de 0.07 a 7.1 μM de NH_4) (Zadorojny et al. 1973).
- Para celdas de 1 cm se recomienda usar un rango de 0.013 a 1.3 mg/l NH_4 (es decir, de 0.7 a 72 μM de NH_4).
- Para mejorar la precisión instrumental, las diluciones deberán ser realizadas para que correspondan con valores de absorbancia de entre 0.20 a 0.85.
- Las muestras deben ser filtradas con un filtro de fibra de vidrio (GF/F) de 0.45 μm antes de su tratamiento.

Longitud de onda y tiempo de reacción

- 640 nm
- Las muestras deben ser colocadas en oscuridad y con aluminio sobre ellas por 60 min. El color producido será estable al menos por 24 horas.

Reactivos

- Agua destilada
- Fenol grado reactivo (C_6H_5OH ; CAS: 108-95-2; Sigma-Aldrich)
- Alcohol etílico absoluto (CH_3CH_2OH ; CAS: 64-17-5; High purity)
- Nitroprusiato de sodio [$Na_2Fe(CN)_5NO \cdot 2H_2O$; CAS: 13755-38-9; Sigma-Aldrich]
- Citrato de sodio ($HOC(COONa)(CH_2COONa)_2 \cdot 2H_2O$; CAS: 6132-04-3; Sigma-Aldrich)
- Hidróxido de sodio (NaOH; CAS: 1310-73-2; Sigma-Aldrich)
- Hipoclorito de sodio 1.5 N o comercial al 12% (Cloralex verde frasco pequeño)
- Sulfato de amonio [$(NH_4)_2SO_4$; CAS: 7783-20-2; Sigma-Aldrich]

Materiales y equipos

- Espectrofotómetro VIS con rango de 400-900 nm (Shimadzu, UV-1800, Shimadzu Inc., Kyoto, Japan)
- Balanza analítica
- Campana de extracción
- Micropipeta 0-1000 μ l
- Celdas de vidrio de 10-cm
- Tubos Falcon de 50 ml
- Pipetas de 1ml
- Pipetas de 2 ml
- Puntas para pipetas (0-1000 μ l)
- Frascos ámbar de 150-200 ml
- Frasco de vidrio 500 ml
- Vasos de precipitado de 50 ml
- Matraz aforado de 100 ml
- Probeta de 200 ml
- Espátulas

Preparación de reactivos

1. **Alcohol al 95% (v/v):** Colocar 195.5 ml de alcohol absoluto y llevar a un volumen final de 200 ml con agua destilada. Guardar en un frasco de vidrio. En caso de contar con alcohol etílico al 95-96% usar éste directamente.
2. **Solución de fenol-alcohol:** Disolver 10 gramos de fenol grado reactivo en 100 ml de alcohol al 95% v/v. Guardar en un frasco ámbar de vidrio.
3. **Nitroprusiato de sodio (0.5%):** Disolver 1 gramo de nitroprusiato de sodio [$Na_2-Fe(CN)_5NO \cdot 2 H_2O$] en 200 ml de agua destilada. Almacenar en un frasco ámbar no más de 1 mes.

4. **Solución alcalina:** Disolver 100 g de citrato de sodio y 5 gramos de hidróxido de sodio en 500 ml de agua destilada. Guardar en un frasco de vidrio.
5. **Solución de hipoclorito de sodio:** Usar una solución de hipoclorito de sodio comercial al 5.25% (cloralex o clorox); esta solución debería ser al menos 1.5 N. Se pueden guardar pequeñas alícuotas a 4 °C y ser usadas en un periodo no mayor a 15 días.
6. **Solución oxidante:** Mezclar 100 ml de la solución alcalina y 25 ml de hipoclorito de sodio. Mantener esta solución tapada mientras no se ocupa. Preparar diariamente.
7. **Solución concentrada de sulfato de amonio (10,000 μM de NH_4):** En un matraz, colocar 0.06607 gramos (66.07 mg) de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ y aforar a 100 ml con agua destilada. Una vez utilizada la solución concentrada, regresar al refrigerador a 4 °C. La solución es estable varios meses. Guardar en un frasco ámbar de vidrio.
8. **Solución diluida de sulfato de amonio (100 μM de NH_4):** En un matraz colocar 1 ml de la solución concentrada de sulfato de amonio y aforar a 100 ml con agua destilada. Esta solución debe prepararse diariamente.

Preparación de la curva

Para la preparación de la curva se usará la solución diluida de 100 μM de NH_4 y se harán varias diluciones que correspondan con los puntos de la curva que irán de 0.07 a 7 μM de NH_4 (Tabla 3). Cada punto de la curva se preparará por triplicado. La información se resume en la Tabla 3. Las diluciones pueden ser hechas en tubos Falcon o de vidrio.

Tabla 3. Preparación de las diluciones a partir de la solución diluida de 100 μM de NH_4 . El volumen total de cada dilución es de 35 ml.

No. de dilución	1	2	3	4	5	6	7
Dilución (μM NH_4)	0.00	0.07	1.40	2.80	4.20	5.60	7.00
Solución diluida (μl)	0	24.5	490	1400	1750	2100	2450
Agua destilada (ml)	35	34.976	34.510	33.600	33.250	32.900	32.550

Una vez preparadas las diluciones, etiquetarlas del uno al siete (pueden ser preparadas en tubos Falcon). Posteriormente se agregará a cada tubo Falcon la solución de fenol, nitroprusiato y solución oxidante (Tabla 4; ver Fig. 7). Finalmente, todos los puntos de la curva se incuban por una hora en oscuridad. Posteriormente se leen a 640 nm en un espectrofotómetro (Fig. 7), y se anota el valor de la absorbancia. Si todo se hizo correctamente, debería ser apreciable un gradiente azul que aumentará en intensidad conforme la concentración de NH_4 aumente (Fig. 8).

Tabla 4. Reactivos para agregar a las alícuotas de cada dilución. El orden de los reactivos se muestra de manera descendente.

Reactivo	Cantidad (ml)
Solución de fenol al 10%	1.4
Nitroprusiato de sodio 0.5%	1.4
Solución oxidante	3.5

Preparación de las muestras

La determinación de amonio en las muestras se puede hacer por duplicado. Entonces se usarán dos tubos Falcon de 50 ml por muestra, en los cuales se agregarán 30 ml de muestra en cada uno. Posteriormente, se agregará a cada tubo Falcon la solución de fenol, nitroprusiato y solución oxidante (Tabla 5). Finalmente, se incubarán todas las muestras por una hora en oscuridad y se leerá su absorbancia a 640 nm (Fig. 9).

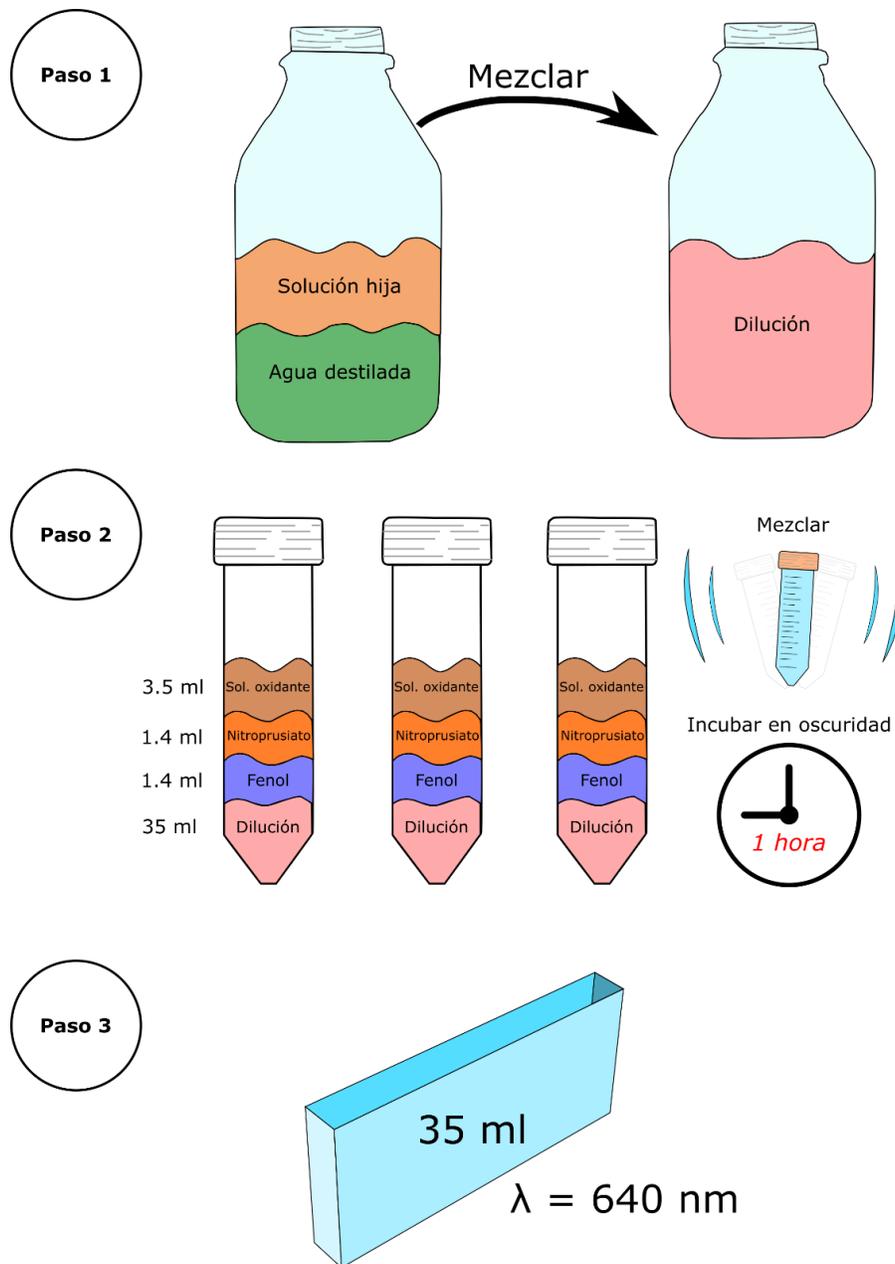


Figura 7. Resumen del procedimiento para preparar los puntos de la curva de amonio. En el **Paso 1** se muestra que se debe agregar a un frasco de vidrio la solución diluida más agua destilada y mezclar. Posteriormente, en el **Paso 2** se muestra que cada dilución se dividirá en tres tubos Falcon y se le agregará fenol, nitroprusiato y solución oxidante, se mezclará y se dejará incubar por una hora. Finalmente, en el **Paso 3** se usará una celda de 10 cm, la cual lleva 35 ml de volumen y se leerá a 640 nm.

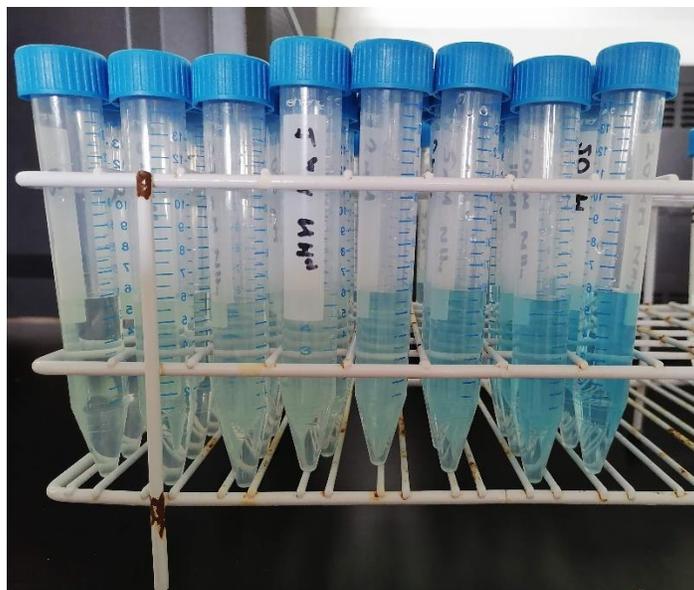


Figura 8. Curva de amonio. En la imagen se puede observar el gradiente de color azul relacionado con la concentración (de izquierda a derecha).

Tabla 5. Preparación de las muestras para la determinación de amonio. Se indica la cantidad de muestra, así como la cantidad y orden de los reactivos a agregar. En total, cada tubo Falcon debe terminar con 35.4 ml, más que suficiente para colocar en la celda de 10 cm que requiere un volumen de 35 ml.

Reactivo	Cantidad (ml)
Muestra	30
Solución de fenol al 10%	1.2
Nitroprusiato de sodio 0.5%	1.2
Solución oxidante	3.0

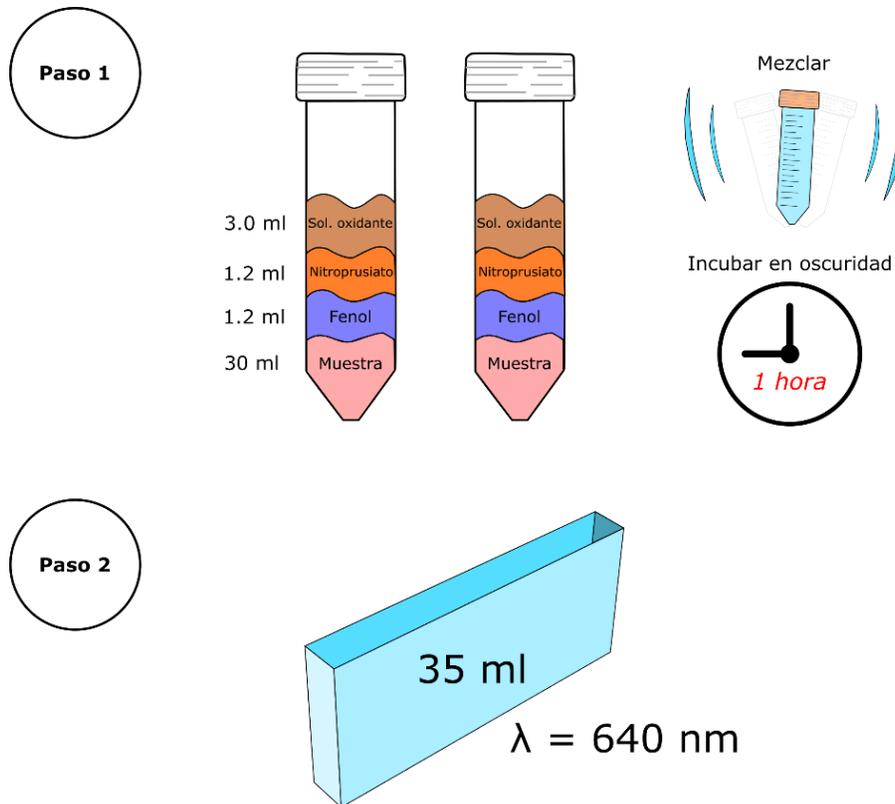


Figura 9. Resumen del procesamiento para la determinación de amonio en muestras. En el **Paso 1** se muestra la cantidad de muestra y los reactivos que se utilizan, así como su tiempo de incubación. En el **Paso 2** se usará una celda de 10 cm, la cual lleva 35 ml de volumen y se leerá a 640 nm.

Cálculo de la ecuación de la recta y concentraciones

La fórmula para calcular la concentración de micromoles de NH_4 se obtiene calculando la pendiente y el intercepto de la curva estándar y posteriormente utilizando la ecuación de la recta para hallar la concentración de NH_4 (Fig. 10).

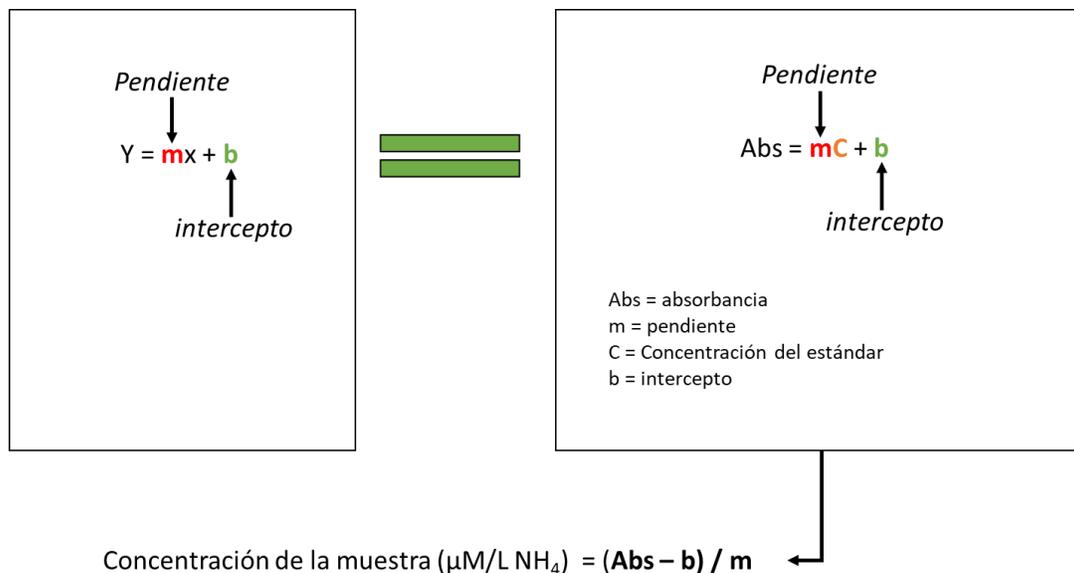


Figura 10. Ecuación de la recta y sustitución de los parámetros calculados con la curva estándar de amonio. En la parte inferior de la figura se encuentra la fórmula para calcular la concentración de la muestra.

Recomendaciones

- La boca de los viales debe ser cubierta con papel aluminio para evitar cualquier contaminación posible. Preferiblemente viales de vidrio.
- Si la absorbancia sobrepasa el punto superior de la curva, es posible hacer la dilución directa de la muestra ya tratada con agua destilada. Hay que recordar que esto implica que hay un factor de dilución. Si la muestra se diluye con agua destilada en una proporción 1:1 se debe multiplicar el valor de la concentración calculada por 2.
- Todos los frascos deben ser protegidos de la luz excesiva para evitar la sobreproducción del color azul.

Anexo I

Si las muestras de agua contienen ácido sulfhídrico será necesario removerlo por acidificación a pH 3 con ácido clorhídrico diluido, seguido por aireación vigorosa (gas inerte como el helio) hasta que no se detecte ningún olor a sulfuro (Wetzel y Likens, 2000). Posteriormente, se debe neutralizar la muestra con hidróxido de sodio diluido.

Anexo II

La concentración de NH_4 y NH_3 están siempre en equilibrio en el agua, y dependen del pH, la salinidad, la presión y la temperatura. Una hoja de cálculo de Excel puede ser descargada (https://fisheries.org/docs/pub_hatch/pub_ammonia_swc.xls) si los valores de NH_3 y NH_4 desean ser calculados.

Referencias

- Grasshoff, K., Kremling, K. & Ehrhardt, M. (1999) Methods of seawater analysis. John Wiley & Sons. Verlag Chemie, Weinheim.
- Hampson, B. L. (1977). Relationship between total ammonia and free ammonia in terrestrial and ocean waters. ICES Journal of Marine Science, 37(2), 117-122.
- Solorzano, L. (1969). Determination of ammonia in natural waters by the phenolhypochlorite method. Limnology and oceanography, 14(5), 799-801.
- Strickland, J. D. H., & Parsons, T. R. (1972). A practical handbook of seawater analysis. Bull. No. 167, Fisheries Research Board, Canada.
- Wetzel, R. G., & Likens, G. E. (2013). Limnological analyses. Springer Science & Business Media. Springer Science & Business Media. New York.
- Whitfield, M. (1974). The hydrolysis of ammonium ions in sea water-a theoretical study. Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom, 54(3), 565-580.
- Zadorojny, C., Saxton, S., & Finger, R. (1973). Spectrophotometric determination of ammonia. Journal (Water Pollution Control Federation), 45, 905-912.

Determinación de nitrito (NO₂)

La presente técnica para la determinación de nitrito (NO₂) está basada en el protocolo propuesto por Shinn, (1941) modificado por Bendschneider y Robinson, (1952). El fundamento de la técnica envuelve la reacción del nitrito con sulfanilamida (proceso de diazotación). Posteriormente, el compuesto diazo resultante reacciona con el *N*-(1-naphtyl)-etilendiamina y forma un tinte azo altamente coloreado que es medido a 543 nm. Esta reacción produce un color fucsia proporcional a la concentración de NO₂ (Strickland y Parson, 1972). Se ha demostrado que el color producido no es afectado por la salinidad y, por lo tanto, esta técnica puede usarse tanto para agua dulce como marina (Bendschneider y Robinson, 1952). El color se desarrolla rápidamente y es estable por aproximadamente dos horas (Bendschneider y Robinson, 1952). Para la laguna de Puerto Morelos, las concentraciones de NO₂ van de los 0.05 a los 0.06 μM de NO₂ (Hernández-Terrones et al. 2011) y en los acuarios las concentraciones pueden ser tan bajas como estas o hasta los 108 μM de NO₂ o más. El nitrito es un subproducto de la degradación del amonio y este metabolito puede llegar a ser tóxico para los organismos acuáticos, tales como peces e invertebrados (Lucas et al. 2019). En acuarios su concentración es en ocasiones tan baja que los kits comerciales son incapaces de determinar su concentración. Por lo anterior, es recomendable utilizar técnicas de laboratorio que permitan determinar su concentración.

Rango de determinación, diluciones y filtración

- Para celdas de 10 cm (100 mm) de 0 a 2.14 μM NO₂ (Wetzel y Likens, 2013).
- Para celdas de 1 cm (10 mm) de 0.7 a 21.42 μM NO₂ (Wetzel y Likens, 2013).
- Las muestras deben ser filtradas por un filtro de 0.45 μm antes de su tratamiento.

Longitud de onda y tiempo de reacción

- 543 nm
- Se requieren 10 minutos después de agregar todos los reactivos para que el color alcance su máxima intensidad (proteger de la luz directa). El color es estable por dos horas.

Reactivos

- Agua destilada
- Ácido clorhídrico (HCl; CAS: 7647-01-0; Sigma-Aldrich)
- Sulfanilamida (C₆H₈N₂O₂S; CAS: 11799; Supelco)

- Diclorhidrato de n-(1-naftil)-etilendiamina ($C_{10}H_7NHCH_2NH_2 \cdot 2HCl$; CAS: 1465-25-4; Sigma-Aldrich)
- Nitrito de sodio ($NaNO_2$; CAS: 7632-00-0; Sigma-Aldrich)

Materiales y equipos

- Espectrofotómetro VIS con rango de 400-900 nm
- Balanza analítica
- Campana de extracción
- Micropipeta 0-1000 μ l
- Celdas de vidrio de 1-cm o 10-cm
- Viales de 40 ml
- Pipetas de 1ml
- Pipetas de 1-5 ml
- Puntas para pipetas (0-1000 μ l)
- Puntas para pipetas (1-5 ml)
- Frascos ámbar de 150-200 ml

Preparación de reactivos

- 1. Solución de sulfanilamida:** Disolver 2.5 gramos de sulfanilamida en 25 ml de ácido clorhídrico concentrado (sp. gr. 1.18). Esta solución debe ser lentamente agregada a 150 ml de agua destilada. Finalmente, el volumen se completa a 250 ml con agua destilada. Guardar en un frasco ámbar. La solución es estable por varios meses.
- 2. Solución de N-(1-naftil)-etilendiamina diclorhidrato:** Disolver 0.5 gramos del N-(1-naphtyl) en agua destilada y completar a 500 ml con agua destilada. Almacenar en un frasco ámbar. Renovar una vez al mes o antes si un color café-oscuro se desarrolla.
- 3. Solución concentrada de nitrito (10,000 μ M NO_2):** Antes de usar el nitrito de sodio hay que secarlo a 100°C por 1 hora y colocarlo en un desecador. Posteriormente, pesar 0.690 g y disolver en 1 litro de agua destilada. La solución contiene 10 mM NO_2 (10,000 μ M NO_2) y debería ser almacenada en frío y oscuridad.
- 4. Solución diluida de nitrito (100 μ M NO_2):** En un matraz colocar 5 mililitros de la solución concentrada de nitrito y aforar a 500 ml con agua destilada. Esta solución diluida contendrá 100 μ M NO_2 . Esta solución debe prepararse diariamente.

Preparación de la curva

Para la preparación de la curva se usará la solución diluida 100 μM NO_2 y se harán varias diluciones que correspondan con los puntos de la curva que irán de 0.05 a 7.0 μM NO_2 . Todos los puntos deben prepararse por triplicado. La información se resume en la Tabla 6. Las diluciones pueden ser hechas en tubos Falcon o viales de vidrio.

Tabla 6. Preparación de las diluciones de nitrito a partir de la solución diluida de 100 μM NO_2 . El volumen total de cada dilución es de 35 ml.

No. de dilución	1	2	3	4	5	6	7
Dilución (μM NO_2)	0.00	0.05	0.5	0.9	1.3	1.7	2.1
Solución diluida (μl)	0.0	17.50	175.0	315.0	455.0	595.0	735.0
Agua destilada (ml)	35	34.983	34.825	34.685	34.545	34.405	34.265

Una vez preparadas las diluciones, etiquetarlas del uno al siete (Fig. 11). Posteriormente se agregará a cada tubo una serie de reactivos (Fig. 11): la solución de sulfanilamida y la de N-(1-naftil)-etilendiamina (Tabla 7). Después de agregar la solución de sulfanilamida hay que esperar 5 min antes de agregar la solución de N-(1-naftil)-etilendiamina. Finalmente, esperar 10 min a que se desarrolle completamente el color fucsia y leer a 543 nm (Fig. 11). Anotar los valores de absorbancia en la bitácora. Si todo se hizo correctamente, debería ser apreciable un gradiente de color fucsia que aumentará en intensidad conforme la concentración de NO_2 aumente (Fig. 12).

Tabla 7. Reactivos que se agregarán a las alícuotas de cada dilución de nitrito. El orden de los reactivos y el tiempo que hay que esperar después de agregar cada reactivo se muestran de manera descendente.

Reactivo	Cantidad (ml)	Tiempo de espera (min)
Solución de sulfanilamida	0.7	5
Solución de N-(1-naftil)-etilendiamina	0.7	10

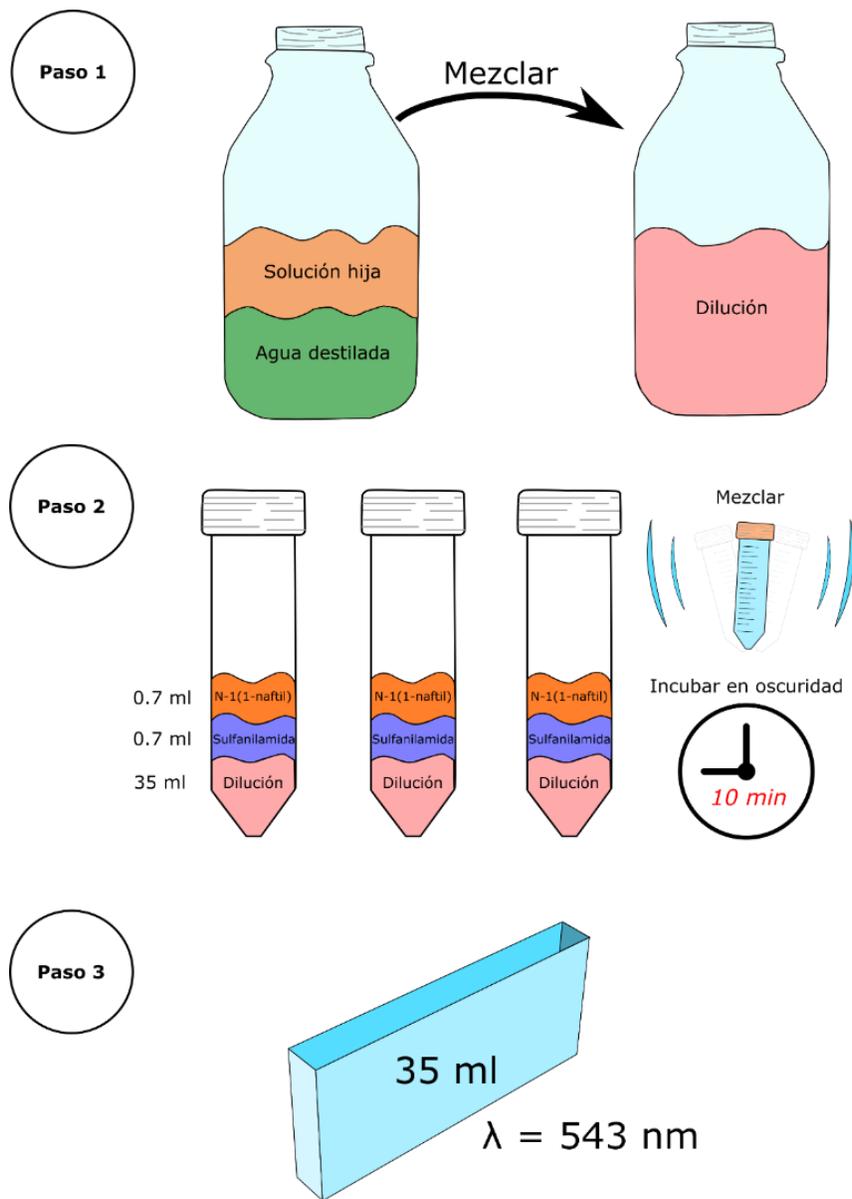


Figura 11. Resumen del procedimiento para preparar los puntos de la curva de nitrito. En el **Paso 1** se muestra que se debe agregar a un frasco de vidrio la solución diluida más agua destilada y mezclar para hacer las diluciones de la Tabla 6. Posteriormente, en el **Paso 2** se muestra que cada punto de la curva debe hacerse por triplicado. A cada vial se le agregará sulfanilamida y de N-(1-naftil)-etilendiamina. El color fucsia se desarrollará después de 10 min. Finalmente, en el **Paso 3** se usará una celda de 10 cm, la cual lleva 35 ml de volumen y se leerá a 543 nm.

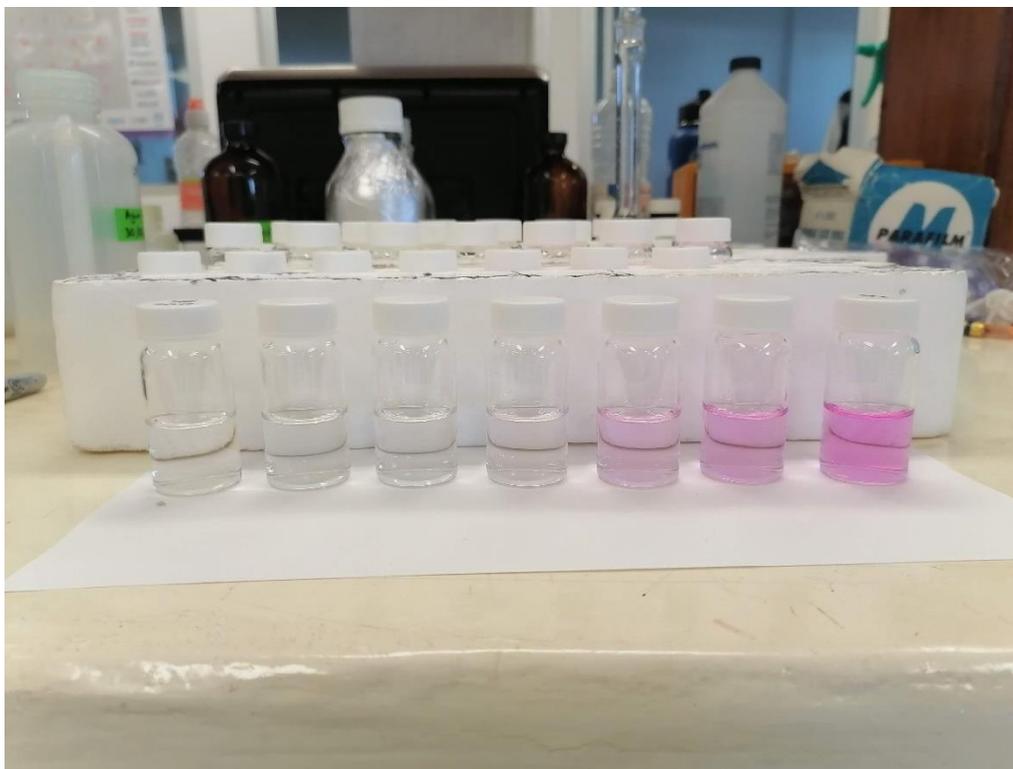


Figura 12. Curva de nitrito. En la imagen se puede observar el gradiente de color fucsia relacionado con la concentración (de izquierda a derecha).

Preparación de las muestras

La determinación de nitrito en las muestras se hará por duplicado. Entonces, se usarán dos tubos de 50 ml por muestra, en los cuales se agregarán 35 ml de muestra en cada uno. Posteriormente, se agregará a cada tubo una serie de reactivos: la solución de sulfanilamida y la de N-(1-naftil)-etilendiamina (Tabla 8). Finalmente, se incubarán todas las muestras por 10 min y se leerá su absorbancia a 543 nm en una celda de 10 cm (Fig. 13).

Tabla 8. Preparación de las muestras. Se muestran las cantidades a utilizar. En total, cada tubo Falcon terminará con 36.4 ml, más que suficiente para colocar en la celda de 10 cm que requiere un volumen de 35 ml.

Reactivo	Cantidad (ml)
Muestra	35
Solución de sulfanilamida	0.7
Solución N-(1-naftil)-etilendiamina	0.7

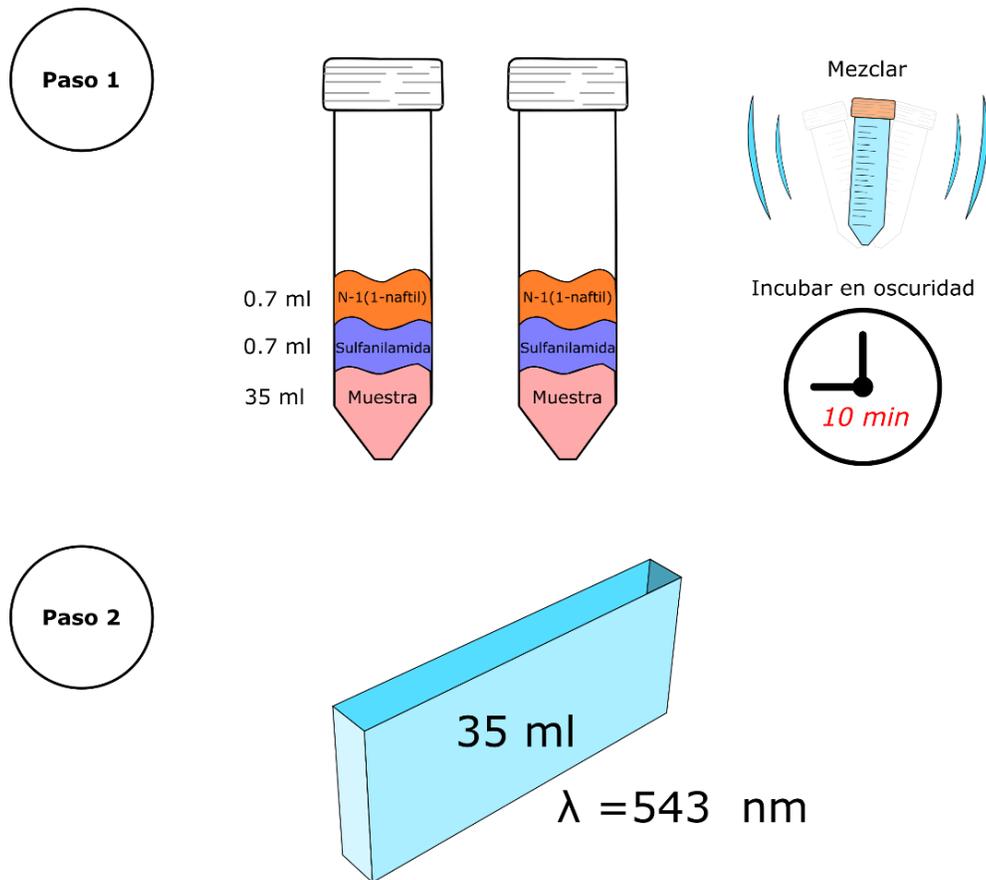


Figura 13. Resumen del procesamiento de las muestras de nitrito. En el **Paso 1** se observan las cantidades requeridas de muestra y reactivos, así como su tiempo de incubación. En el **Paso 2** se usará una celda de 10 cm, la cual lleva 35 ml de volumen y se leerá a 543 nm.

Cálculo de la ecuación de la recta y concentraciones

La fórmula para calcular la concentración de μM de NO_2 se obtiene calculando la pendiente y el intercepto de la curva estándar y posteriormente utilizando la ecuación de la recta para hallar la concentración de NO_2 (Fig. 14).

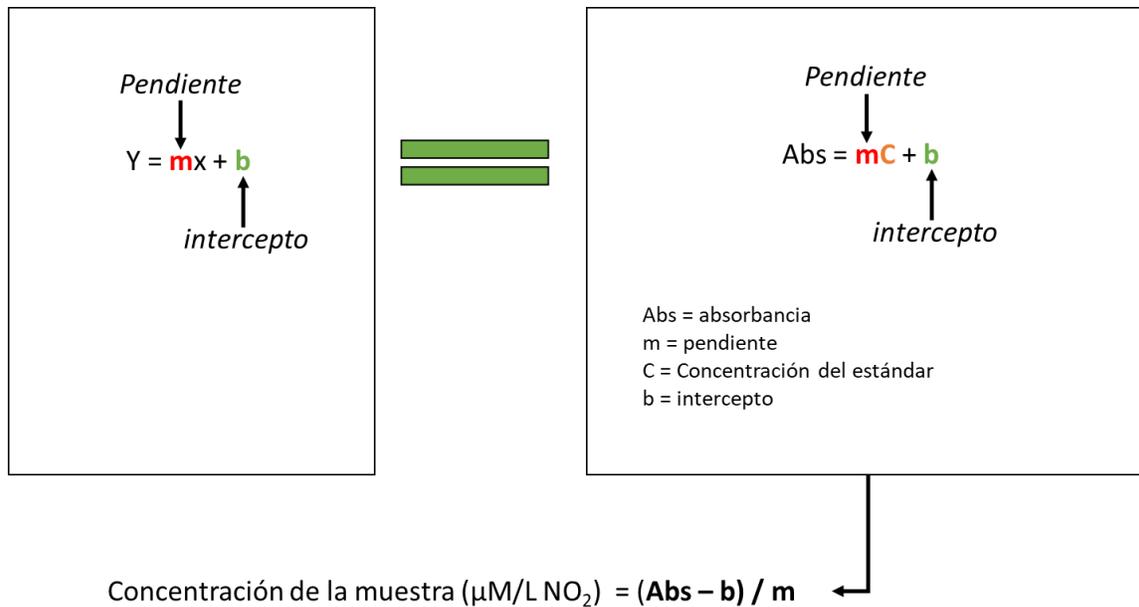


Figura 14. Ecuación de la recta y sustitución de los parámetros calculados con la curva estándar de nitrito. En la parte inferior de la figura se encuentra la fórmula para calcular la concentración de la muestra.

Recomendaciones

- La boca de los viales debe ser cubierta con papel aluminio para evitar cualquier contaminación posible.
- Si la absorbancia sobrepasa el punto superior de la curva, es posible hacer la dilución directa de la muestra ya tratada con agua destilada. Hay que recordar que esto implica que hay un factor de dilución. Si la muestra se diluye con agua destilada en una proporción 1:1 se debe multiplicar el valor de la concentración calculada por 2.

Referencias

- American Public Health Association (APHA). (2005). Standard methods for the examination of water and wastewater. American Public Health Association (APHA): Washington, DC, USA.
- Bendschneider, K., & Robinson, R. J. (1952). A new spectrophotometric method for the determination of nitrite in sea water. *Journal of Marine Research*, 11 (1952).
- Hernández-Terrones, L., Rebolledo-Vieyra, M., Merino-Ibarra, M., Soto, M., Le-Cossec, A., & Monroy-Ríos, E. (2011). Groundwater pollution in a karstic region (NE Yucatan): Baseline nutrient content and flux to coastal ecosystems. *Water, Air, & Soil Pollution*, 218(1), 517-528.
- Lucas, J. S., Southgate, P. C., & Tucker, C. S. (2019). *Aquaculture: Farming aquatic animals and plants*. John Wiley & Sons.
- Shinn, M. B. (1941). Colorimetric method for determination of nitrate. *Industrial & Engineering Chemistry Analytical Edition*, 13(1), 33-35.
- Strickland, J. D. H., & Parsons, T. R. (1972). *A practical handbook of seawater analysis*. Bull. No. 167, Fisheries Research Board, Canada.
- Wetzel, R. G., & Likens, G. E. (2013). *Limnological analyses*. Springer Science & Business Media. New York.

Determinación de nitrato (NO₃)

La presente técnica para la determinación de nitrato (NO₃) está basada en el protocolo propuesto por García-Robledo et al. (2014). El fundamento de la técnica está basado en la reducción del NO₃ a NO₂ a través de cloruro de vanadio III (VCl₃) y al mismo tiempo determinar la concentración de todo el NO₂ en la muestra con el método Shinn, (1941) modificado por Bendschneider y Robinson, (1952) (ver protocolo anterior para la determinación de nitrito). La reducción del NO₃ a NO₂ se hace generalmente a través del uso de nitrato reductasas o del uso de cadmio (Grasshoff, 1983). Actualmente, la técnica más usada es la reducción del NO₃ con una columna de cadmio a NO₂ (Grasshoff, 1983). Sin embargo, esta técnica consume mucho tiempo, es difícil de llevar a cabo y el cadmio es altamente tóxico (García-Robledo et al. 2014). Otro agente reductor actualmente utilizado es el VCl₃, el cual es mucho menos tóxico que el cadmio. A altas temperaturas y condiciones ácidas, el VCl₃ reduce el NO₃ a NO₂. Además, el uso del VCl₃ permite la determinación secuencial del NO₃ y NO₂ en la misma muestra (García-Robledo et al. 2014). Para la laguna de Puerto Morelos, la concentración de NO₃ se encuentra entre los 0.22 y 13.9 μM (Hernández-Terrones et al. 2011; Ruíz-Rentería et al. 1998). El NO₃ en los sistemas de acuicultura es el último paso en la secuencia de nitrificación del amonio. Por lo tanto, en los acuarios es un buen indicador de si el proceso de nitrificación ha sido establecido con éxito. Su toxicidad es relativamente baja en crustáceos, recomendándose mantener las concentraciones < 3.2 mmol de NO₃. En corales se recomiendan valores por debajo de 8.1 μM NO₃. Al parecer, la acción tóxica en organismos acuáticos es que provoca que la hemoglobina y hemocianina sean incapaces de transportar oxígeno (Furtado et al. 2015).

Rango de determinación y filtración

- En celdas de 1 cm (10 mm) de 0.05 a 30 μM.
- Las muestras deben ser filtradas por un filtro de 0.45 μm antes de su tratamiento.

Longitud de onda y tiempo de reacción

- 543 nm
- Es necesario incubar a 60°C por 25 min.

Reactivos

- Agua destilada
- Ácido clorhídrico 37% (sp. gr. 1.18)
- Sulfanilamida (C₆H₈N₂O₂S; CAS: 11799; Supelco)
- N-(1-naftil)-etilendiamina diclorhidrato (C₁₀H₇NHCH₂NH₂ · 2HCl; CAS: 1465-25-4; Sigma-Aldrich)
- Nitrito de sodio (NaNO₂; CAS: 7632-00-0; Sigma-Aldrich)
- Nitrato de potasio (KNO₃; CAS: 7757-79-1; Fermont)
- Cloruro de vanadio III (VCl₃; CAS: 7718-98-1; Sigma-Aldrich)

Materiales y equipos

- Espectrofotómetro VIS con rango de 400-900 nm
- Balanza analítica
- Campana de extracción
- Micropipeta 0-1000 µl
- Celdas de vidrio de 1-cm
- Viales de 40 ml
- Pipetas de 1ml
- Pipetas de 1-5 ml
- Puntas para pipetas (0-1000 µl)
- Puntas para pipetas (1-5 ml)
- Frascos ámbar de 150-200 ml
- Filtro GF/F de 0.45 µm
- Jeringas de 50 ml

Preparación de reactivos

- 1. Solución de HCl 6N:** Lentamente agregar 49.270 ml de HCl concentrado (37 %) a 25 ml de agua destilada. Finalmente, ajustar el volumen a 100 ml de agua destilada.
- 2. Solución de sulfanilamida:** Disolver 2.5 gramos de sulfanilamida en 25 ml de ácido clorhídrico concentrado (sp. gr. 1.18). Esta solución debe ser lentamente agregada a 150 ml de agua destilada. Finalmente, el volumen se completa a 250 ml con agua destilada. Guardar en un frasco ámbar. La solución es estable por varios meses.
- 3. Solución de N-(1-naftil)-etilendiamina diclorhidrato:** Disolver 0.5 gramos de N-(1-naftil) en agua destilada y completar a 500 ml con agua destilada. Almacenar en un frasco ámbar. Renovar 1 vez al mes o antes si un color café-oscuro se desarrolla.

- 4. Solución tricloruro de vanadio (VCl_3) al 2% p/v:** disolver 1 gramo de VCl_3 y aforar a 50 ml con una solución de HCl 6N. La disolución completa tarda alrededor de una hora, y esta es evidente por un cambio de una solución turbia a transparente. La solución finalmente se filtra a través de un filtro de 0.7 μm . La solución es estable por varias semanas. Se debe refrigerar.
- 5. Solución concentrada de nitrito (10,000 μM NO_2):** Antes de usar el nitrito de sodio hay que secarlo a 100 °C por 1 hora y colocarlo en un desecador. Posteriormente, pesar 0.690 g y disolver en 1 litro de agua destilada. La solución contiene 10 mM NO_2 (10,000 μM NO_2) y deberá ser almacenada en frío y oscuridad.
- 6. Solución diluida de nitrito (100 μM NO_2):** En un matraz colocar 250 μl de la solución concentrada de nitrito y aforar a 500 ml con agua destilada. Esta solución diluida contendrá 10 μM NO_2 . Esta solución debe prepararse diariamente.
- 7. Solución concentrada de nitrato (10, 000 μM):** disolver 0.2527 g de KNO_3 (secado en el horno por al menos 1 hora a 100 °C) en 250 ml de agua destilada.
- 8. Solución diluida de nitrato (10 μM):** tomar 250 μl de la solución concentrada de nitrato y aforar a 250 ml con agua destilada.

Preparación de la curva

Esta técnica requiere preparar dos curvas, una para nitrito y otra para nitrato; ambas con VCl_3 . Para la curva de nitrito se usará una solución 10 μM NO_2 , mientras que para la curva de nitrato se usará una solución diluida 10 μM NO_3 . Todos los puntos deben prepararse por triplicado. Dado que ambas curvas tendrán el mismo rango de concentraciones en cuanto a NO_2 y NO_3 , y las soluciones diluidas son de 10 μM ambas, la información para la preparación de ambas curvas se resume en la Tabla 9 y Fig. 15. Las diluciones deben ser hechas en viales de vidrio de 40 ml.

Tabla 9. Preparación de las diluciones a partir de la solución diluida de 10 μM NO_2 o NO_3 . El volumen total de cada dilución es de 10 ml.

No. de dilución	1	2	3	4	5	6	7
Dilución (μM NO_2 o NO_3)	0.00	0.1	0.5	1.0	3.0	5.0	10.0
Solución diluida (μl)	0.0	100.0	500.0	1000.0	3000.0	5000.0	10000.0
Agua destilada (ml)	10.0	9.900	9.500	9.000	7.000	5.000	0.000

Una vez preparadas las diluciones, etiquetarlas del uno al siete. Posteriormente, se agregará a cada vial la sulfanilamida y después de 5 min se agregará el N-(1-naftil)-etilendiamina. Después de 10 min, se agregará el VCl_3 (Tabla 10; Fig. 15). Finalmente, los viales son colocados en un baño maría a 60 °C por 25 min con el fin de que se desarrolle el color fucsia. Si todo se hizo correctamente, en ambas curvas se deberá tener un gradiente color fucsia que aumentará en intensidad conforme la concentración de NO_2 aumente (Fig. 16). Para la curva de nitrato el color fucsia no debería ser evidente sino hasta después de su incubación, ya que no debería haber nitrito que reaccione con la sulfanilamida y el N-(1-naftil)-etilendiamina.

Tabla 10. Reactivos que se agregarán a las alícuotas de cada dilución. El orden de los reactivos y el tiempo que hay que esperar después de agregar cada reactivo se muestran de manera descendente.

Reactivo	Cantidad (ml)	Tiempo de espera (min)
Solución de sulfanilamida	0.2	5
Solución N-(1-naftil)-etilendiamina	0.2	10
VCl_3	1	25*

*Los 25 min deben transcurrir en la incubadora a 60 °C.

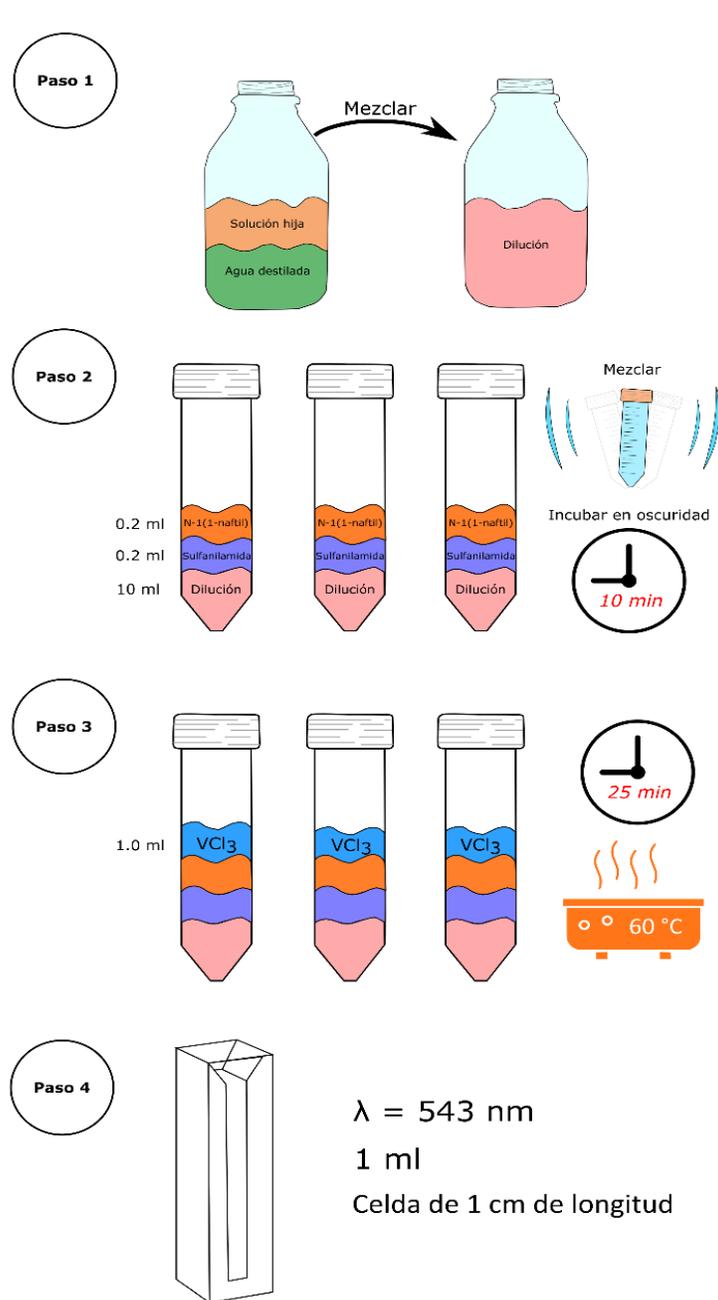


Figura 15. Resumen del procedimiento para preparar los puntos de la curva tanto de nitrito como de nitrato. En el **Paso 1** se muestra que se debe agregar a un frasco de vidrio la solución diluida más agua destilada y mezclar para hacer cada una de las diluciones de la Tabla 9. Posteriormente, en el **Paso 2** se muestra que cada punto de la curva debe hacerse por triplicado. A cada vial se le agregará sulfanilamida y N-(1-naftil)-etilendiamina. En el **Paso 3** se agrega el VCl₃ y se incuba a 60 °C por 25 min. Finalmente, en el **Paso 4** se usará una celda de 1 cm, la cual lleva 1 ml de volumen y se leerá a 543 nm.

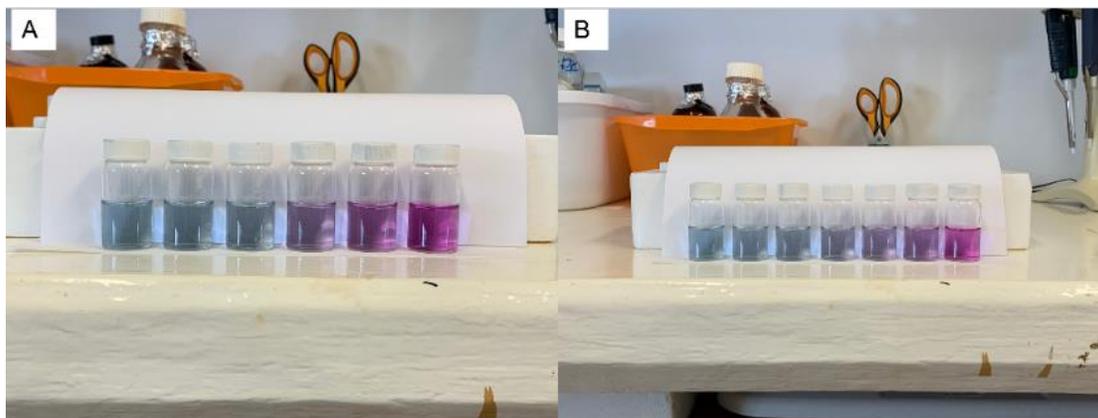


Figura 16. A) Curva de nitrito y B) curva de nitrato. Ambas curvas fueron incubadas a 60°C por 25 min para desarrollar el color fucsia.

Preparación de las muestras

La determinación del NO₃ en las muestras se hará por duplicado. Entonces, se usarán dos viales por muestra, en los cuales se agregarán 10 ml de muestra previamente filtrada (Fig. 17). Posteriormente, se agregarán a cada vial los mismos reactivos y tiempos de espera que para la curva (Tabla 9).

Cálculo de la ecuación de la recta y concentraciones

Para la determinación del nitrato se requiere conocer cuatro variables: la absorbancia de la muestra, la concentración de nitrito en la muestra, la pendiente de la curva de calibración del nitrito más cloruro de vanadio y la pendiente de la curva de calibración del nitrato más cloruro de vanadio. A partir de estas incógnitas será posible utilizar la siguiente ecuación para determinar la concentración del NO₃ en la muestra:

$$\mu\text{M NO}_3 = ((\text{Abs}_{\text{NO}_x} - \text{Abs}_{\text{Blanco}}) - S_{\text{NO}_2} [\text{NO}_2]) / S_{\text{NO}_3}$$

Donde Abs_{NO_x} es la absorbancia de la muestra, Abs_{Blanco} es la absorbancia del blanco, S_{NO₂} es la pendiente de la curva de nitrito más cloruro de vanadio, [NO₂] es la concentración de nitrito en la muestra (la cual debe ser determinada previamente) y S_{NO₃} es la pendiente de la curva de nitrato más cloruro de vanadio.

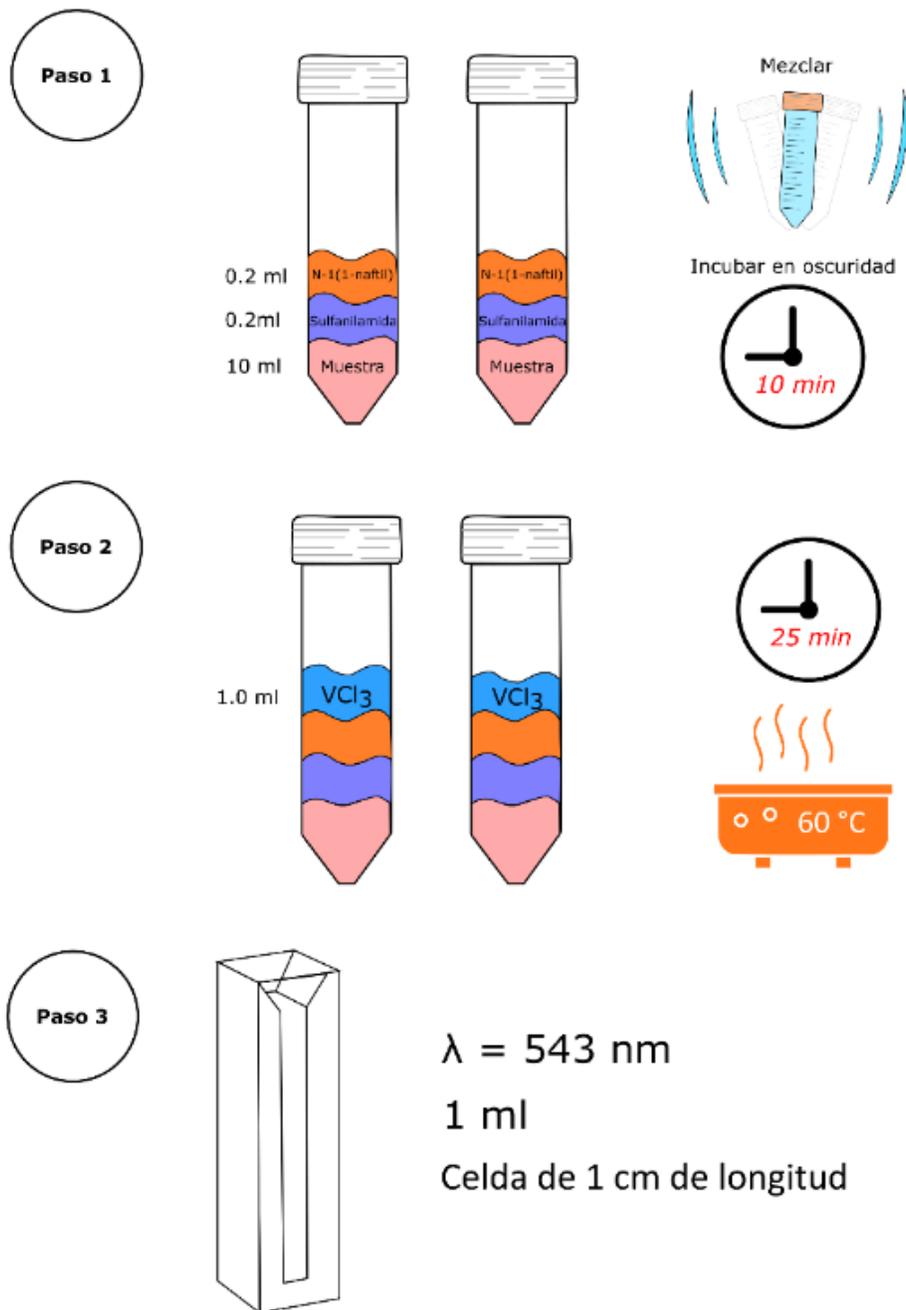


Figura 17. Resumen del procesamiento de las muestras de nitrato. En el **Paso 1** se observan las cantidades requeridas de muestra y reactivos, así como su tiempo de incubación. En el **Paso 2** se usará una celda de 1 cm, la cual lleva 1 ml de volumen y se leerá a 543 nm.

Referencias

- Furtado, P. S., Campos, B. R., Serra, F. P., Klosterhoff, M., Romano, L. A., & Wasielesky, W. (2015). Effects of nitrate toxicity in the Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, reared with biofloc technology (BFT). *Aquaculture international*, 23(1), 315-327.
- García-Robledo, E., Corzo, A., & Papaspyrou, S. (2014). A fast and direct spectrophotometric method for the sequential determination of nitrate and nitrite at low concentrations in small volumes. *Marine Chemistry*, 162(2014), 30-36.
- Grasshoff, K., Kremling, K., & Ehrhardt, M. (1983). *Methods of seawater analysis*. John Wiley and Sons. Verlag Chemie, Weinheim
- Hernández-Terrones, L., Rebolledo-Vieyra, M., Merino-Ibarra, M., Soto, M., Le-Cossec, A., & Monroy-Ríos, E. (2011). Groundwater pollution in a karstic region (NE Yucatan): Baseline nutrient content and flux to coastal ecosystems. *Water, Air, & Soil Pollution*, 218(1), 517-528.
- Ruíz-Rentería, F., van Tussenbroek, B. I., & Jordán-Dahlgren, E. (1998). *Puerto Morelos, Quintana Roo, Mexico. CARICOMP: Caribbean*
- Shinn, M. B. (1941). Colorimetric method for determination of nitrate. *Industrial & Engineering Chemistry Analytical Edition*, 13(1), 33-35.

Determinación de fosfato (PO₄)

La presente técnica para la determinación de fosfato (PO₄) está basada en el protocolo propuesto por Murphy y Riley, (1962) y las recomendaciones propuestas por Strickland & Parsons, (1972). El fundamento de esta técnica se basa en la determinación del PO₄ con ayuda de una solución ácida que contiene molibdato de amonio, ácido ascórbico y antimonio. Estos reactivos reaccionan rápidamente con el PO₄ del agua y producen un color azul (Murphy y Riley, 1962; Strickland y Parsons, 1972). Posteriormente, el compuesto es medido a 885 nm. Para la laguna de Puerto Morelos se han encontrado valores mínimos y máximos de 0.1 y 3.59 μM PO₄ respectivamente (Hernández-Terrones et al. 2011). Al igual que con los otros nutrientes (p. ej. nitrito y nitrato), el PO₄ tiende a acumularse en los acuarios que reciclan el agua (Rojsitthisak et al. 2017). En general, no se ha encontrado que el PO₄ sea tóxico para los organismos marinos, pero en muchas ocasiones se considera un elemento limitante (Wetzel y Likens, 2000). No obstante, cuando se presenta en altas concentraciones, este puede dejar de ser limitante y producir florecimientos de microalgas que empobrecen la calidad del agua de los acuarios. Si bien, el PO₄ en bajas concentraciones es benéfico para los corales y pastos marinos, su incremento en los acuarios puede causar eutrofización y comprometer la calidad del agua donde viven estos organismos (Kim et al. 2013). Cuando se ocupan kits comerciales, la recomendación es que el PO₄ se encuentre en niveles indetectables en los acuarios, pero como ya se ha establecido anteriormente, estos kits no tienen la resolución para determinar la concentración de PO₄ en los acuarios (Schubert et al. 2017).

Rango de determinación y filtración

- El método es aplicable en un rango de 0.03 a 16.14 μM PO₄
- Las muestras de agua deben ser filtradas con filtros de fibra de vidrio (GF/F) de 0.6 – 0.7 μm).

Longitud de onda y tiempo de reacción

- 885 nm
- Se requieren 5 min para que el color se desarrolle completamente

Reactivos

- Agua destilada
- Ácido sulfúrico (H₂SO₄; CAS: 7664-93-9; J.T. Baker)
- Molibdato de amonio [(NH₄)₆ MO₇O₂₄ · 4H₂O]; CAS: 0716-01; J.T. Baker)

- Ácido ascórbico ($C_6H_8O_6$; CAS: 50-81-7; Sigma-Aldrich)
- Tartrato de potasio antimonio ($C_4H_4KO_7Sb$; CAS: 12054-85-2; Fermont)
- Dihidrógeno fosfato de potasio (KH_2PO_4 ; CAS: 7778-77-0; Supelco)

Materiales y equipos

- Espectrofotómetro VIS con rango de 400-900 nm
- Balanza analítica
- Campana de extracción
- Micropipeta 0-1000 μ l
- Celdas de vidrio de 1-cm o 10-cm
- Viales de 40 ml
- Pipetas de 1ml
- Pipetas de 1-5 ml
- Puntas para pipetas (0-1000 μ l)
- Puntas para pipetas (1-5 ml)
- Frascos ámbar de 150-200 ml

Preparación de reactivos

1. **Solución de molibdato de amonio** [$(NH_4)_6 MO_7O_{24} \cdot 4H_2O$]: Disolver 15 g de molibdato de amonio en agua destilada. Aforar a 500 ml con agua destilada. Almacenar en una botella de vidrio ámbar lejos de la luz. La solución es estable por varias semanas.
2. **Solución de ácido sulfúrico** (H_2SO_4): Mezclar 70 ml de ácido sulfúrico concentrado ($d = 1.82$ g/ml) con 450 ml de agua destilada. Dejar enfriar y almacenar en un recipiente de vidrio.
3. **Solución de ácido ascórbico** ($C_6H_8O_6$): Disolver 10.8 gramos de ácido ascórbico en 200 ml de agua destilada. Almacenar la solución en recipiente plástico protegido de la luz solar y congelar. Descongelar para uso y volver a congelar nuevamente. La solución es estable durante semanas.
4. **Solución de tartrato de potasio antimonio** ($C_4H_4KO_7Sb$): Disolver 0.34 g de reactivo en 250 ml de agua destilada. Calentar moderadamente en placa de calentamiento. Almacenar bajo refrigeración en recipiente plástico o vidrio. La solución es estable durante meses.

5. **Reactivo mixto:** mezclar en su orden 20 ml de solución de molibdato, 50 ml de solución de ácido sulfúrico, 20 ml de solución de ácido ascórbico y 10 ml de solución de tartrato de potasio; esta solución se debe preparar diariamente, es estable por cuatro horas.
6. **Solución concentrada de fosfato (10,000 $\mu\text{M PO}_4$):** Disolver 0.1361 g de dihidrógeno fosfato de potasio (KH_2PO_4) (previamente seco a 104 °C por dos horas), en 100 ml de agua destilada. Almacenar en una botella oscura con 50 μl de cloroformo. Es estable por varios meses.
7. **Solución diluida de fosfato (10 $\mu\text{M PO}_4$):** En un matraz colocar 100 microlitros de la solución concentrada de PO_4 y aforar a 100 ml con agua destilada. Esta solución diluida contendrá 10 $\mu\text{M PO}_4$. Esta solución debe prepararse diariamente.

Preparación de la curva

Para la preparación de la curva se usará la solución diluida 10 $\mu\text{M PO}_4$ y se harán varias diluciones que correspondan con los puntos de la curva que irán de 0.1 a 5 $\mu\text{M PO}_4$. Todos los puntos deben ser preparados por triplicado. La información se resume en la Tabla 11. Las diluciones pueden ser hechas en tubos Falcon o viales de vidrio.

Tabla 11. Preparación de las diluciones a partir de la solución diluida de 10 $\mu\text{M PO}_4$. El volumen total de cada dilución es de 10 ml.

No. de dilución	1	2	3	4	5	6	7
Dilución ($\mu\text{M PO}_4$)	0.00	0.1	1	2	3	4	5
Solución diluida (μl)	0.0	100.0	1000.0	2000.0	3000.0	4000.0	5000.0
Agua destilada (ml)	10	9.900	9.000	8.000	7.000	6.000	5.000

Una vez preparadas las diluciones, etiquetarlas del uno al siete. Posteriormente se agregará a cada tubo Falcon 1 ml del reactivo mixto (Fig. 18). Esperar 5 min a que se desarrolle completamente el color azul y leer en el espectrofotómetro a 885 nm (Fig. 18). Anotar los valores de absorbancia en la bitácora. Si todo se hizo correctamente, debería ser apreciable un gradiente de color azul que aumenta en intensidad conforme la concentración de PO_4 aumenta (Fig. 19).

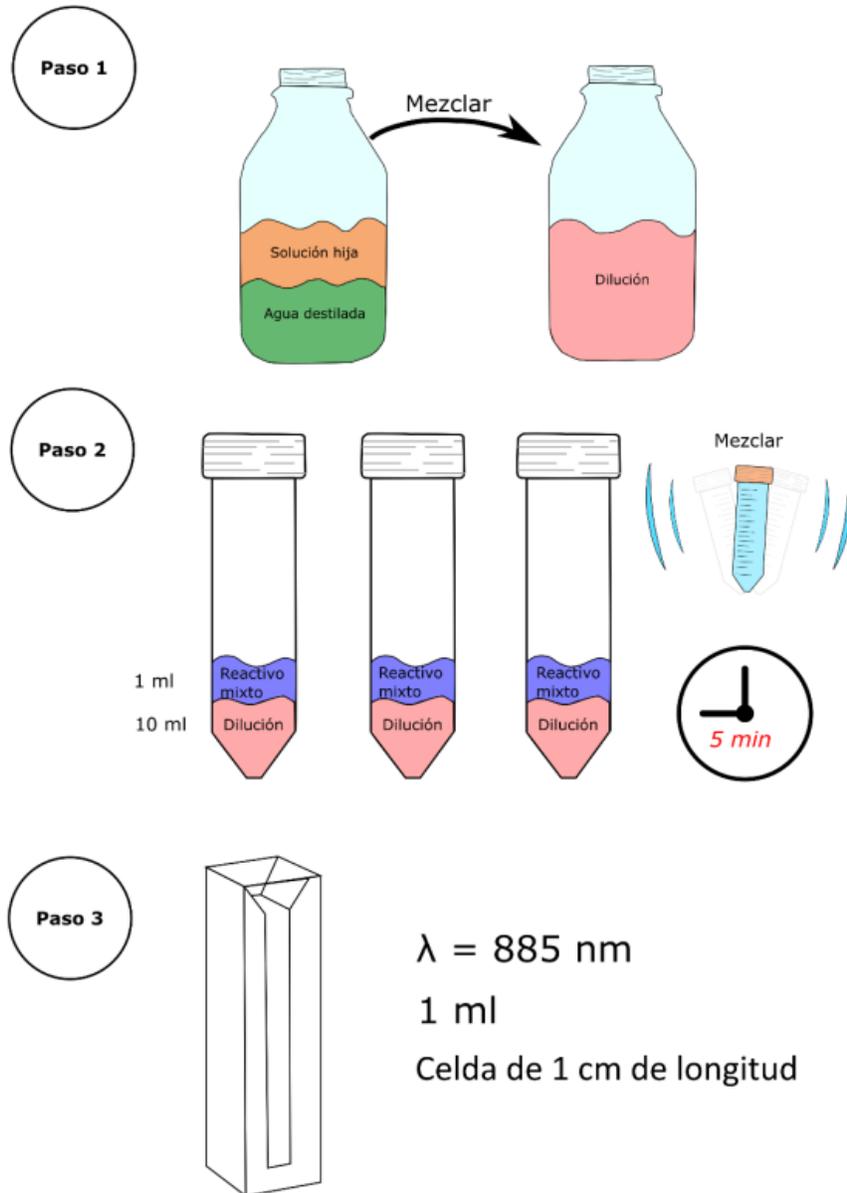


Figura 18. Resumen del procedimiento para preparar los puntos de la curva de fosfato. En el **Paso 1** se muestra que se debe agregar a un frasco de vidrio la solución diluida más agua destilada y mezclar para hacer cada una de las diluciones de la Tabla 11. Posteriormente, en el **Paso 2** se muestra que cada punto de la curva debe hacerse por triplicado. A cada tubo Falcon se le agregará 1 ml del reactivo mixto. Finalmente, en el **Paso 3** se usará una celda de 1 cm, la cual lleva 1 ml de volumen y se leerá a 885 nm.

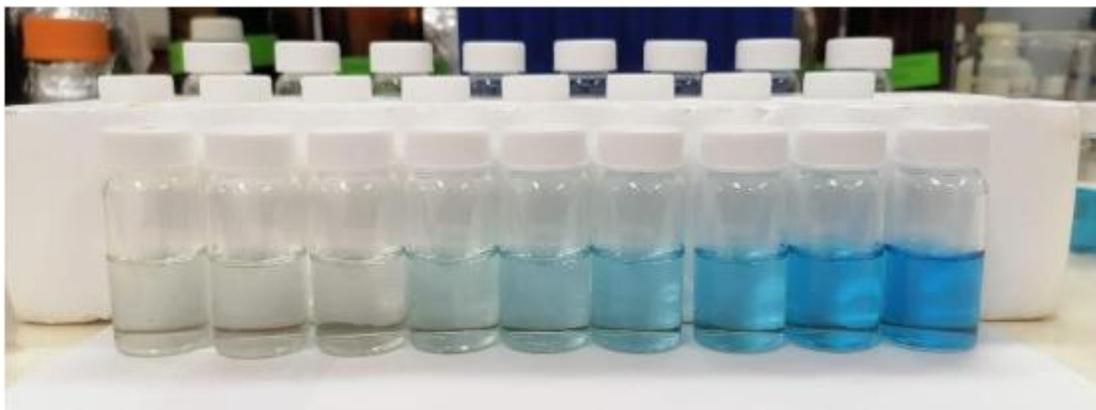


Figura 19. Curva de fosfato. En la imagen se puede observar el gradiente de color azul relacionado con la concentración (de izquierda a derecha).

Preparación de las muestras

La determinación del PO_4 en las muestras se hará por duplicado. Entonces, se usarán dos tubos Falcon de 15 ml por muestra, en los cuales se agregarán 10 ml de la muestra y posteriormente 1 ml del reactivo mixto (Fig. 20). Esperar 5 min y leer las muestras en el espectrofotómetro a 885 nm (Fig. 20).

Cálculo de la ecuación de la recta y concentraciones

La fórmula para calcular la concentración de micromoles de PO_4 se obtiene calculando la pendiente y el intercepto de la curva estándar y posteriormente utilizando la fórmula para hallar la concentración de PO_4 de la Figura 21.

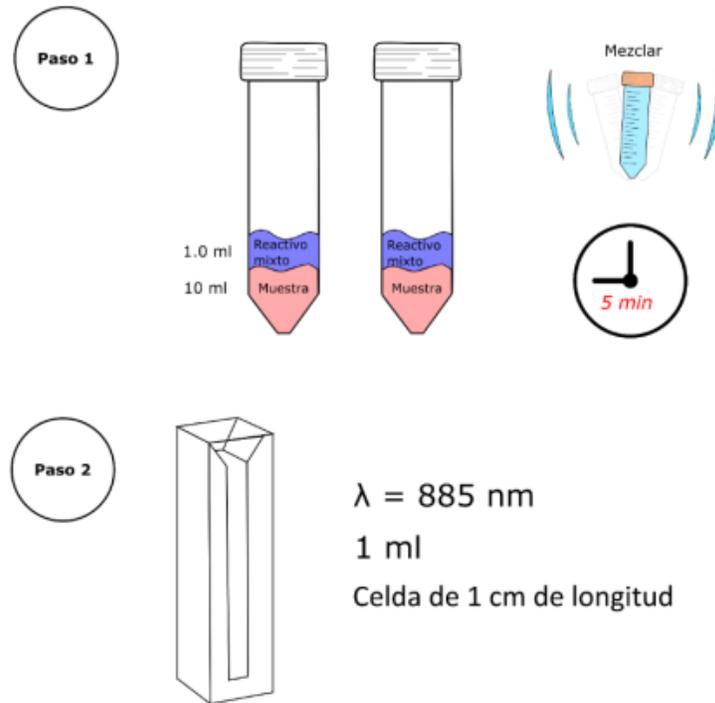


Figura 20. Resumen del procesamiento de las muestras de fosfato. En el **Paso 1** se observan las cantidades requeridas de muestra y reactivos, así como su tiempo de incubación. En el **Paso 2** se usará una celda de 1 cm, la cual lleva 1 ml de volumen y se leerá a 885 nm.

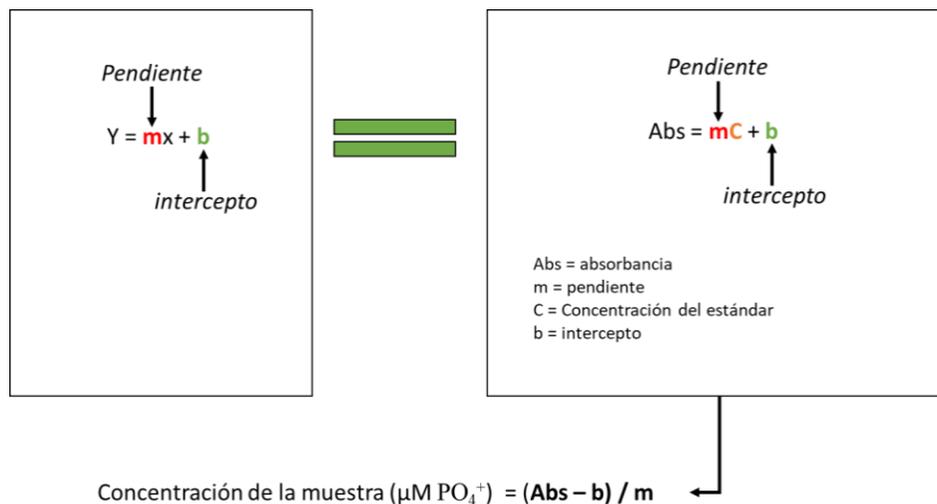


Figura 21. Ecuación de la recta y sustitución de los parámetros calculados con la curva estándar de fosfato. En la parte inferior de la figura se encuentra la fórmula para calcular la concentración de la muestra.

Referencias

- Hernández-Terrones, L., Rebolledo-Vieyra, M., Merino-Ibarra, M., Soto, M., Le-Cossec, A., & Monroy-Ríos, E. (2011). Groundwater pollution in a karstic region (NE Yucatan): Baseline nutrient content and flux to coastal ecosystems. *Water, Air, & Soil Pollution*, 218(1), 517-528.
- Kim, E., Yoo, S., Ro, H.Y., Han, H.J., Baek, Y.W., Eom, I.C., Kim, H.M., Kim, P., & Choi, K. (2013). Aquatic toxicity assessment of phosphate compounds. *Environmental health and toxicology*, 28(2013), 1-7.
- Murphy, J., & Riley, J. P. (1962). A modified single solution method for the determination of phosphate in natural waters. *Analytica chimica acta*, 27, 31-36.
- Rojsitthisak, P., Burut-Archanai, S., Pothipongsa, A., & Powtongsook, S. (2017). Repeated phosphate removal from recirculating aquaculture system using cyanobacterium remediation and chitosan flocculation. *Water and Environment Journal*, 31(4), 598-602.
- Schubert, P., Wilke, T., Schubert, P., & Wilke, T. (2017). Coral microcosms: Challenges and opportunities for global change biology. En *Corals in a Changing World*. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.68770>
- Strickland, J. D. H., & Parsons, T. R. (1972). A practical handbook of seawater analysis. Bull. No. 167, Fisheries Research Board, Canada.
- Wetzel, R. G., & Likens, G. E. (2000). *Limnological analyses*. Springer Science & Business Media. New York.

Determinación de la dureza total, calcio y magnesio

La determinación de la dureza total, calcio y magnesio está basada la metodología propuesta por la APHA (APHA, 1998). Otras metodologías han sido propuestas en la literatura, pero requieren equipos muy costosos y personal altamente capacitado para poder llevarlas a cabo (APHA, 1998; Grasshoff et al. 2009). La dureza total es la concentración de cationes divalentes en el agua, también expresado como CaCO_3 (Boyd et al. 2016). Los principales cationes divalentes que aportan a la dureza son el Ca^{2+} y Mg^{2+} , aunque también pueden estar presentes el Sr^{2+} , Fe^{2+} , y Mn^{2+} en menor proporción (Boyd et al. 2016). Por lo anterior, es posible expresar la concentración de estos cationes como equivalentes de CaCO_3 , y de esta manera calcular cuál es su aporte a la dureza total. El fundamento de la técnica, tanto para determinar la dureza total como el calcio consiste en el uso de indicadores tales como el negro de eriocromo T (NET) para la dureza total y la murexida para la determinación del calcio a elevados pH (Boyd et al. 2016). Estos indicadores formarán complejos con los cationes divalentes y provocarán que se presente una coloración rojiza cuando se usa el NET y una coloración rosada cuando se utiliza la murexida. Finalmente, el último paso implica la titulación con ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) el cual va a quelar los iones metálicos, por lo que removerá los cationes de los complejos formados y se generará el vire de color (NET = rojo \rightarrow azul; murexida = rosado \rightarrow azul-violeta) (APHA, 1998; Boyd et al. 2016). La dureza total en aguas marinas puede llegar a los ~ 6600 mg CaCO_3/l , mientras que la concentración del calcio generalmente se encuentra entre los 400 – 450 mg Ca^{2+}/l (dureza de calcio = ~ 1125 mg CaCO_3/l) y el magnesio en alrededor de 1300 – 1500 mg Mg^{2+}/l (dureza de magnesio = ~ 1125 mg CaCO_3/l (5562 mg CaCO_3/l). A diferencia de los nutrientes que se van concentrando en el agua de los acuarios, los cationes divalentes tienden a ser secuestrados por los organismos de cultivo para llevar a cabo sus funciones fisiológicas, por lo que se espera que conforme pase el tiempo tanto la dureza como los valores de calcio y magnesio se vayan reduciendo. Algunas especies de organismos de cultivo tendrán requerimientos de calcio y magnesio en el agua. Por ejemplo, los crustáceos absorben calcio del agua cuando mudan, y las concentraciones de calcio deben ser lo suficientemente elevadas para abastecer sus requerimientos. De hecho, en camarones y langostas, bajas concentraciones de calcio y magnesio (y, por lo tanto, la dureza total) podrían afectar su crecimiento (Boyd, 1990; Cheng et al. 2005). En plantas, el calcio es parte de su pared celular y el magnesio es parte de la

molécula de clorofila (Boyd et al. 2016). En pastos marinos el calcio es importante en la regulación osmótica y el magnesio en el proceso de fotosíntesis (Vonk et al. 2018). En corales el calcio está relacionado con su proceso de calcificación. En términos de la calidad del agua, un elevado pH y una alta concentración de Ca^{2+} puede causar la precipitación del fósforo el cual es esencial para los organismos fotosintéticos. Finalmente, el calcio puede ayudar a prevenir elevados pH causado por la fotosíntesis en los sistemas de cultivo con baja alcalinidad (capacidad buffer); elevados pH pueden ocasionar que el amonio se vuelva más tóxico ($> \text{pH}$ genera una mayor concentración de NH_3) (Boyd et al. 2016).

Reactivos

- Agua destilada
- Hidróxido de sodio (NaOH ; CAS: 1310-73-2; Sigma-Aldrich)
- Hidróxido de amonio (NH_4OH ; CAS: 1336-21-6; Sigma-Aldrich)
- Ácido clorhídrico (HCl ; CAS: 7647-01-0; Sigma-Aldrich)
- Cloruro de amonio (NH_4Cl ; CAS: 12125-02-9; Sigma-Aldrich)
- Cloruro de sodio (NaCl ; CAS: 7647-14-5; Sigma-Aldrich)
- Negro de eriocromo T ($\text{C}_{20}\text{H}_{12}\text{N}_3\text{NaO}_7\text{S}$; 1787-61-7; Sigma-Aldrich)
- Murexida (purpurato de amonio; CAS: 3051-09-0; Sigma-Aldrich)
- Clorhidrato de hidroxilamina (ClH_4NO ; CAS: 5470-11-1; FisherScientific)
- EDTA- Na_2 ($\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{Na}_2\text{O}_8 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; CAS: 6381-92-6; Sigma-Aldrich)
- EDTA-Mg ($(\text{NaOOCCH}_2)_2\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_2\text{COO})_2\text{Mg} \cdot x\text{H}_2\text{O}$; CAS: 14402-88-1; Sigma-Aldrich)
- Carbonato de calcio (CaCO_3 ; CAS: 471-34-1; Sigma-Aldrich)

Material y equipos

- Bureta graduada
- Balanza analítica
- Micropipeta 0-1000 μl
- Vasos de precipitado
- Matraz Erlenmeyer
- Espátulas
- Placa de agitación
- Agitadores magnéticos
- Frascos ámbar
- Matraces aforados

Preparación de reactivos

1. **Hidróxido de sodio 1 N:** Disolver 40.0 gramos de NaOH en 1 litro de agua destilada.
2. **HCl 1:1:** Disolver 200 ml de HCl concentrado con 200 ml de agua destilada.
3. **Solución amortiguadora:** Disolver 16.9 gramos de cloruro de amonio (NH_4Cl) en 143 ml de hidróxido de amonio concentrado (NH_4OH), agregar 1.25 g de EDTA-Mg y diluir a 250 ml con agua destilada. Guardar en frasco de vidrio.
4. **Murexida:** Con el fin de preparar una mezcla estable del indicador, mezclar 200 mg de murexida con 100 g de NaCl bien pulverizado. Guardar en frasco de vidrio.
5. **Negro de eriocromo T (NET):** Disolver 0.5 g de NET con 4.5 g de clorhidrato de hidroxilamina en 100 ml de alcohol etílico al 95% o alcohol isopropílico. Guardar en frasco de vidrio.
6. **Solución EDTA 0.01M:** Pesar 3.722 g de EDTA disolver en agua destilada y aforar a 1000 ml con agua destilada. Nota: esta solución debe ser valorada (ver sección “*valoración de la solución EDTA*”) con una solución de carbonato de calcio. Guardar en frasco de vidrio.
7. **Solución estándar de CaCO_3 :** pesar 1 g de CaCO_3 anhidro en un matraz de Erlenmeyer. Colocar un embudo en el cuello del matraz y agregar lentamente HCl 1:1 hasta que el CaCO_3 se disuelva completamente. Posteriormente agregar 200 ml de agua destilada y hervir por unos minutos para expulsar el CO_2 . Dejar enfriar la solución y agregarle unas cuantas gotas de rojo de metilo y ajustar a un color intermedio agregando HCl 1:1, como sea necesario. Transferir toda la solución a un matraz aforado de 1 litro y aforar con agua destilada (1 ml de la solución será igual a 1 mg CaCO_3).

Valoración de la solución EDTA

Tomar 10 ml de la solución estándar de CaCO_3 y diluir a 50 ml con agua destilada en un matraz Erlenmeyer de 250 ml. Agregar 1 a 2 ml de la solución amortiguadora para llevar a un pH de 10. Agregar 1 a 2 gotas del indicador NET. Titular con la solución de EDTA 0.01 M, hasta el vire rojo-azul. Utilizar la siguiente fórmula para calcular el factor F.

$F = \text{mg de } \text{CaCO}_3 \text{ en la solución titulada} / \text{mililitros de la solución de EDTA 0.01 M empleada}$

Determinación de la dureza total (mg CaCO₃/l)

Colocar 25 ml de la muestra en un matraz Erlenmeyer y llevar a 50 ml con agua destilada (Fig. 22). Colocar el matraz sobre una placa de agitación y colocar un agitador magnético. Empezar a agitar. Agregar 1 a 2 ml de la solución amortiguadora. Usualmente con 1 ml es suficiente para alcanzar un pH de 10. Agregar 1 a 2 gotas del indicador NET. Empezar a titular con la solución de EDTA 0.01 M hasta observar un vire de color rojo a azul (Fig. 22). Anotar en la bitácora la cantidad de la solución EDTA 0.01 M utilizada.

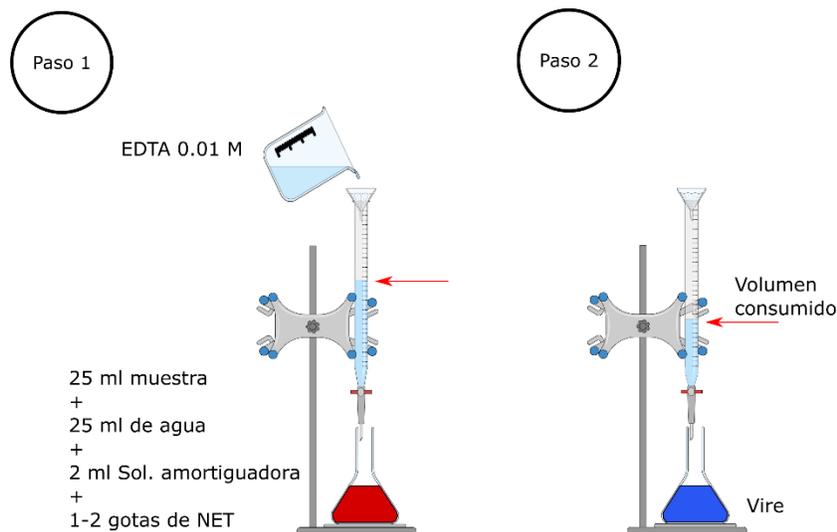


Figura 22 Resumen de la determinación de la dureza total. En el **Paso 1** se indica la cantidad de muestra y reactivos a agregar, así como el llenado de la bureta. En el **Paso 2**, se observa el volumen consumido de la solución de EDTA y el cambio de coloración.

Determinación de calcio (mg Ca²⁺/l)

Tomar 50 ml de muestra y colocar en un matraz Erlenmeyer (Fig. 23). Colocar el matraz sobre una placa de agitación y colocar un agitador magnético. Empezar a agitar. Agregar 2 ml de la solución NaOH 1 N. Con ayuda de una espátula pequeña, agregar entre 100-200 miligramos del indicador murexida. Finalmente, titular con la solución de EDTA 0.01 M hasta observar un vire de color rosado a azul-violeta (Fig. 23). Anotar en la bitácora la cantidad de la solución EDTA 0.01 M utilizada.

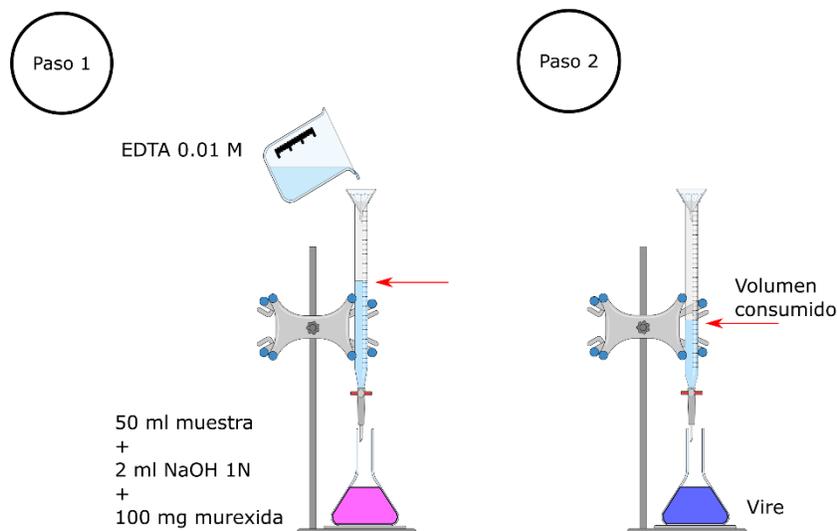


Figura 23. Resumen de la determinación del calcio. En el **Paso 1** se indica la cantidad de muestra y reactivos a agregar, así como el llenado de la bureta. En el **Paso 2**, se observa el volumen consumido de la solución de EDTA y el cambio de coloración.

Cálculo de las concentraciones

Dureza total

La dureza total se expresa con la siguiente formula:

$$\text{mg CaCO}_3/\text{l} = (A \times F \times 1000) / \text{mililitros de la muestra}$$

donde A = ml de la solución EDTA 0.01 M utilizada, F = es el resultado de la valoración de la solución EDTA.

Calcio

$$\text{mg Ca}^{2+}/\text{l} = (A \times F \times 400.8) / \text{mililitros de la muestra}$$

Donde A = ml de la solución EDTA 0.01 M utilizada, F = es el resultado de la valoración de la solución EDTA. La solución EDTA 0.01 M, es equivalente a 400.8 mg Ca/l. El calcio también puede ser expresado como dureza por calcio y se expresa en mg CaCO₃/l, como sigue:

Dureza por Calcio como $\text{mg CaCO}_3/\text{l} = (A \times F \times 1000) / \text{mililitros de la muestra}$

Magnesio

Con los valores de dureza total y dureza por calcio es posible calcular por diferencia la dureza por magnesio (APHA, 1998) como sigue:

$$\text{Dureza por magnesio} = \text{dureza total} - \text{dureza por calcio}$$

Y también es posible convertir la dureza por magnesio a miligramos de magnesio por litro (APHA, 1998) como sigue:

$$\text{mg Mg}^{2+}/\text{l} = \text{dureza por magnesio} / 4.12$$

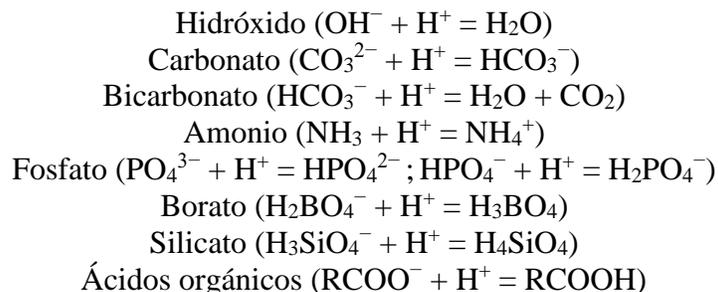
La concentración de un catión divalente multiplicado por su proporción CaCO_3 : peso atómico del catión divalente es la contribución de ese ion a la dureza. En este caso $100.0869/24.305 = 4.12$.

Referencias

- American Public Health Association (APHA). (1998). Standard methods for the examination of water and wastewater (20th ed.). Washington, DC: American public health association
- Boyd, C. E. (1990). Water quality in ponds for aquaculture. Birmingham Publishing Co., Birmingham, AL, USA.
- Boyd, C. E., Tucker, C. S., & Somridhivej, B. (2016). Alkalinity and hardness: Critical but elusive concepts in aquaculture. *Journal of the World Aquaculture Society*, 47(1), 6-41.
- Cheng, K., Hu, C., Liu, Y., Zheng, S., & Qi, X. (2005). Dietary magnesium requirement and physiological responses of marine shrimp *Litopenaeus vannamei* reared in low salinity water. *Aquaculture Nutrition*, 11(5), 385-393.
- Grasshoff, K., Kremling, K., & Ehrhardt, M. (2009). Methods of seawater analysis. John Wiley & Sons. Verlag Chemie, Weinheim
- Vonk, J. A., Smulders, F. O., Christianen, M. J., & Govers, L. L. (2018). Seagrass leaf element content: A global overview. *Marine Pollution Bulletin*, 134, 123-133.

Determinación de la alcalinidad total

La alcalinidad es la concentración total de bases titulables en el agua expresadas como carbonato de calcio (Boyd, 2019; Boyd et al. 2016). Estas bases pueden ser (Boyd et al. 2016):



Generalmente, la alcalinidad que se reporta en el cultivo de organismos acuáticos es la alcalinidad total, es decir, el conjunto de todas aquellas bases titulables en el agua cuando se alcanza un pH de 4.5. En la mayoría de las aguas naturales, casi toda la alcalinidad proviene del HCO_3^{-} , CO_3^{2-} y el OH^{-} . Por lo tanto, la alcalinidad puede ser descrita como (Boyd et al. 2016):

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

Donde los [] indican concentraciones molares.

La determinación de la alcalinidad del presente protocolo sigue las recomendaciones de la (APHA, 1998). Específicamente se describe el protocolo potenciométrico (APHA, 1998). Se eligió este protocolo porque es preciso y cuantitativo, en contraste con el uso de indicadores que requieren una titulación hasta alcanzar un vire de color (Boyd et al. 2016). Se ha descrito, previamente, que detectar el vire de color puede resultar complicado para algunas personas daltónicas (Boyd et al. 2016).

A pesar de que la alcalinidad pueda ser expresada en términos de su concentración molar, en el cultivo de organismos acuáticos es muy común expresarla como una relación peso/volumen (p. ej. mg/l). En los Estados Unidos, la alcalinidad se expresa como miligramos por litro de carbonato de calcio (mg CaCO_3 /l). No obstante, en países europeos, la alcalinidad puede ser expresada en miliequivalentes (meq) por litro de CaCO_3 o de óxido de calcio

(CaO); donde $1 \text{ meq/l} = 50 \text{ mg CaCO}_3/\text{l}$ o 28 mg CaO/l . En aguas marinas y en los acuarios marinos la alcalinidad tiene valores de alrededor de $120 \text{ mg CaCO}_3/\text{l}$ (Boyd et al. 2016).

Dado que la alcalinidad es la capacidad buffer del agua, entonces es uno de los parámetros más importantes para moderar los cambios en el pH provocados por la fotosíntesis y respiración; procesos muy marcados en el amanecer y atardecer-anocheecer en los sistemas de cultivo (Van Wyk et al. 1999). Por ejemplo, en tanques que tienen una alcalinidad de alrededor de $30 \text{ mg CaCO}_3/\text{l}$, los cambios en el pH pueden ir de 5 a 7.5 durante el amanecer (Lawson, 1994) y durante el día cuando la fotosíntesis es máxima, el consumo de CO_2 puede ser tan grande que el pH incrementará hasta valores de 8.5 – 9 (Boyd, 1990). En acuarios, la alcalinidad puede ser consumida por la nitrificación y por los organismos de cultivo. Por ejemplo, la nitrificación consumirá por cada gramo de amonio que procese alrededor de 7.05 g de alcalinidad, además de 4.18 g de oxígeno, y producirá 0.976 g de N-NO_3 y 5.85 g de CO_2 (Ebeling et al. 2006). Es por esta razón, que la alcalinidad debe ser medida de manera rutinaria en los acuarios.

Reactivos

- Agua destilada
- Carbonato de sodio (Na_2CO_3 ; CAS: 497-19-8; Sigma-Aldrich)
- Ácido clorhídrico (HCl; CAS: 7647-01-0; Sigma-Aldrich)
- Ácido sulfúrico (H_2SO_4 ; CAS: 7664-93-9; J.T. Baker)

Materiales y equipos

- Bureta y soporte
- Potenciómetro (pH-metro)
- Placa de agitación
- Agitadores magnéticos
- Matraces aforados
- Vasos de precipitado
- Pipetas
- Probeta
- Balanza analítica
- Buffers pH 4.0, 7.0 y 10.0

Preparación de reactivos

1. **Solución de carbonato de sodio (Na_2CO_3), aproximadamente 0.05 N:** Pesar 2.5 g de carbonato de sodio (previamente secado a 250 °C por 4 horas y enfriado en un desecador) y transferir a un matraz aforado de 1 litro. Agregar agua destilada hasta la marca de aforo y mezclar. Esta solución debe ser preparada semanalmente. La cantidad exacta de carbonato de sodio pesada debe ser anotada para su uso en cálculos posteriores.
2. **Estándar de ácido sulfúrico o ácido clorhídrico 0.1 N (elegir uno u otro):**
 - a. Para ácido sulfúrico: lentamente agregar 1.403 ml de ácido sulfúrico concentrado a 125 ml de agua destilada. Finalmente, ajustar el volumen a 500 ml con agua destilada en un matraz aforado.
 - b. Para ácido clorhídrico: lentamente agregar 4.106 ml de ácido clorhídrico concentrado a 125 ml de agua destilada. Finalmente, ajustar el volumen a 500 ml con agua destilada en un matraz aforado.
3. **Estándar de ácido sulfúrico o ácido clorhídrico 0.02 N (elegir uno u otro):**
 - a. Para ácido sulfúrico: lentamente agregar 281 μl de ácido sulfúrico concentrado a 125 ml de agua destilada. Finalmente, ajustar el volumen a 500 ml con agua destilada en un matraz aforado.
 - b. Para ácido clorhídrico: lentamente agregar 821 μl de ácido clorhídrico concentrado a 125 ml de agua destilada. Finalmente, ajustar el volumen a 500 ml con agua destilada en un matraz aforado.

Nota: Las soluciones estándar de ácido sulfúrico o clorhídrico deben ser valoradas contra una solución de carbonato de sodio 0.05 N para conocer exactamente su normalidad y usar en cálculos posteriores.

Valoración de las soluciones estándar ácido

Agregar en un vaso de precipitado 5 ml o 15 ml de la solución de Na_2CO_3 0.05 N si se va a valorar la solución de ácido 0.02 N o 0.1 N respectivamente. Completar a 100 ml con agua destilada. Colocar en una bureta el ácido a valorar. Colocar el vaso de precipitado con la solución en una placa de agitación con su agitador magnético. Con ayuda de la bureta se

dispensa lentamente el ácido a valorar hasta alcanzar un pH de 4.5. La determinación del pH debe hacerse con un potenciómetro (pH-metro). El cálculo de la normalidad se realiza con la siguiente ecuación:

$$\text{Normalidad, } N = (A \times B) / (53 \times C)$$

Donde: A = gramos de Na_2CO_3 , B = mililitros de la solución de Na_2CO_3 tomados para la valoración, y C = mililitros de ácido utilizados. El 53 proviene del peso equivalente del Na_2CO_3 ($106 \text{ g/mol} \div 2 = 53 \text{ g/eq}$; donde la carga de los iones = 2).

La normalidad del estándar ácido a utilizar debe ser anotada en la bitácora para cálculos posteriores.

Determinación de la alcalinidad ($\text{mg CaCO}_3/\text{l}$)

Colocar 100 ml de muestra en un matraz de vidrio (Fig. 24). Colocar el matraz sobre una placa de agitación y colocar un agitador magnético. Empezar a agitar. Registrar el pH de la muestra con ayuda de un potenciómetro. Si el pH de la muestra es mayor a 8.3, entonces agregar lentamente la solución estándar de ácido hasta alcanzar dicho valor. Apuntar la cantidad de la solución estándar de ácido consumida. Posteriormente, seguir la titulación hasta alcanzar un pH de 4.5 (Fig. 24). Apuntar la cantidad de solución estándar de ácido consumida.

Con los datos obtenidos, podemos calcular entonces la alcalinidad parcial a 8.3 y la alcalinidad total a 4.5 como sigue:

$$\text{Alcalinidad a } pH_{4.5}^{8.3}, \text{mg } \frac{\text{CaCO}_3}{\text{l}} = \frac{A \times N \times 50,000}{V}$$

Donde, A = mililitros de la solución estándar de ácido, N = normalidad del ácido, V = volumen de la muestra. En la ecuación, el 50,000 es una constante que representa el valor equivalente del CaCO_3 (50) multiplicado por 1000 mg.

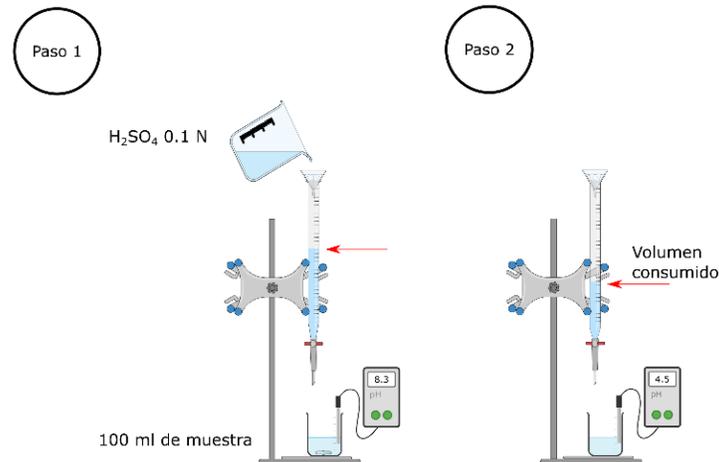


Figura 24. Resumen de la determinación de la alcalinidad total. En el **Paso 1** se indica la cantidad de muestra a utilizar, así como el ácido en la bureta. En el **Paso 2**, se observa el volumen consumido de la solución estándar ácida y el pH objetivo alcanzado.

Referencias

- American Public Health Association (APHA). (1998). Standard methods for the examination of water and wastewater (20th ed.).
- Boyd, C. E. (1990). Water quality in ponds for aquaculture. Birmingham Publishing Co., Birmingham, AL, USA.
- Boyd, C. E. (2019). Water quality: An introduction. Springer Nature. Cham, Switzerland.
- Boyd, C. E., Tucker, C. S., & Somridhivej, B. (2016). Alkalinity and hardness: Critical but elusive concepts in aquaculture. *Journal of the World Aquaculture Society*, 47(1), 6-41.
- Ebeling, J. M., Timmons, M. B., & Bisogni, J. J. (2006). Engineering analysis of the stoichiometry of photoautotrophic, autotrophic, and heterotrophic removal of ammonia-nitrogen in aquaculture systems. *Aquaculture*, 257(1-4), 346-358.
- Lawson, T. B. (1994). Fundamentals of aquacultural engineering. Springer Science & Business Media.
- Van Wyk, P., Davis-Hodgkins, M., Laramore, R., Main, K. L., Mountain, J., & Scarpa, J. (1999). Farming marine shrimp in recirculating freshwater systems (Vol. 7). Harbor Branch Oceanographic Institution Ft. Pierce, FL.