



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

LA ACIDIFICACIÓN OCEÁNICA Y SU IMPACTO EN LOS
ORGANISMOS MARINOS: IMPLEMENTACIÓN DE UNA TÉCNICA
ESPECTROFOTOMÉTRICA PARA MEDIR EL pH EN AGUA DE MAR

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGA

P R E S E N T A :

DUNIA RIOS YUNES

Dr. JOAN ALBERT SÁNCHEZ CABEZA

2015



CIUDAD UNIVERSITARIA, D. F.



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Datos del alumno

Rios

Yunes

Dunia

55 50 29 61

Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Ciencias

Biología

308578603

Datos de tutor

Dr

Joan Albert

Sánchez

Cabeza

Datos del sinodal 2

Dr

Gerardo

Rivas

Lechuga

Datos del sinodal 3

Dr

Jorge Alberto

Ramírez

Zierold

Datos del sinodal 3

Dr.

Hugo Harlán

Mejía

Madrid

Datos del sinodal 4

M en C

Marcia María

Ramírez

Sánchez

Datos de la tesis

La acidificación oceánica y su impacto en los organismos marinos: Implementación de una técnica espectrofotométrica para medir el pH en agua de mar

74p.

2015

DEDICATORIA

A mi mamá Laila porque procuró brindarme la mejor educación y cuidados. Porque sin ella, no podría haber llegado hasta donde estoy hoy y por haberme enseñado que con perseverancia y responsabilidad se puede realizar todo lo que uno se proponga.

A mi papá Octavio porque siempre me apoyó, acompañó y trató de brindarme las mejores herramientas para mi educación y desarrollo. También por siempre darme una opinión y punto de vista crítico.

A mi hermano Sebastián porque ha llenado mi vida de diversión y ha estado a mi lado tanto en momentos de felicidad como de tristeza y él me da consejos sabios.

A mis amigos porque sin ellos mi vida no sería tan feliz, les agradezco por siempre estar allí para platicar y divertirnos.

A mis abuelos porque siempre me han regalado un poco de su experiencia y sabiduría.

A todos con quienes he cruzado camino y me han dejado alguna enseñanza.

A todas aquellas niñas que buscan una oportunidad para estudiar y contribuir a la humanidad por medio de las ciencias y la tecnología.

A todos aquellos hombres y mujeres que impulsaron cambios sociales que actualmente me permiten tener derecho a la educación.

AGRADECIMIENTOS

A el Dr. Joan Albert Sánchez Cabeza por haberme dado la oportunidad de ser su estudiante, por haberme aconsejado, guiado y enseñado y por siempre estar dispuesto a escucharme.

A el Dr. Jorge Ramírez Zierold por haberme acompañado durante todo este proceso, por enseñarme, explicarme e impulsarme a pensar por mí misma y proponer ideas.

A el M. en C. Vladislav Carnero Bravo por darme sugerencias, recomendaciones y ser un muy buen amigo.

A el Dr. Gilberto Cardoso Mohedano por haberme explicado y ayudado a entender mejor las reacciones que se estaban llevando a cabo en mis experimentos y por alentarme a seguir intentando.

Al laboratorio de Fisicoquímica y Biogeoquímica Acuática por haberme facilitado sus instalaciones y material para la realización de los experimentos.

A todos mis profesores desde preescolar hasta la universidad porque sin ellos nada de esto hubiera podido ser posible.

A mi escuela, Liceo Mexicano Japonés, porque gracias a las enseñanzas que obtuve allí, hoy soy una persona responsable hacia mí misma y respetuosa hacia las demás culturas.

A la Universidad Nacional Autónoma de México porque en ella obtuve una excelente formación y cada día en sus aulas tuve la gran alegría de estudiar lo que yo quería.

Out of the night that covers me,
Black as the pit from pole to pole,
I thank whatever gods may be
For my unconquerable soul.

In the fell clutch of circumstance
I have not winced nor cried aloud.
Under the bludgeonings of chance
My head is bloody, but unbowed.

Beyond this place of wrath and tears
Looms but the Horror of the shade,
And yet the menace of the years
Finds, and shall find me, unafraid.

It matters not how strait the gate,
How charged with punishments the scroll,
I am the master of my fate:
I am the captain of my soul

William Ernest Henley (1849–1903)

Tabla de contenido

1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	2
2.1 ACIDIFICACIÓN OCEÁNICA	2
2.2 LA QUÍMICA DEL CARBONATO EN EL AGUA MARINA	3
2.3 SISTEMA DE CARBONO INORGÁNICO EN EL OCÉANO.....	5
3. EFECTOS DE LA ACIDIFICACIÓN	6
3.1 EFECTOS EN LOS ORGANISMOS.....	7
3.2 CAMBIOS EN LA ESTRUCTURA DE LAS COMUNIDADES Y LOS ENLACES TRÓFICOS MARINOS	13
3.3 CAMBIOS BIOGEOQUÍMICOS	13
4. EL PH Y LA ESPECTROFOTOMETRÍA	17
4.1 MÉTODOS DE MEDICIÓN DE PH.....	18
4.2 LA TEORÍA DE LA ESPECTROFOTOMETRÍA	19
4.3 LOS INDICADORES	21
4.4 CORRECCIONES DE LAS LECTURAS.....	23
4.5 PRECAUCIONES.....	24
4.6 CALIBRACIÓN CON TRIS.....	25
4.7 USO DEL ESPECTROFOTÓMETRO.....	25
5. OBJETIVOS	26
5.1 OBJETIVO GENERAL.....	26
5.2 OBJETIVOS PARTICULARES	26
6. HIPÓTESIS	26
7. MATERIAL Y MÉTODOS	27
7.1 AGUA MARINA.....	27
7.2 TRIS.....	28
7.3 PROTOCOLO DE LABORATORIO	29
7.4 PROTOCOLO DE CAMPO	30
7.5 CÁLCULOS	31
7.6 CORRECCIONES Y CALIBRACIÓN	32
7.7 EXPERIMENTACIÓN.....	32
8. RESULTADOS	33
8.1 COMPARACIÓN DE CELDAS.....	33
8.2 EFICIENCIA DEL TERMOSTATO	33
8.3 COMPARACIÓN DE LÁMPARAS	35
8.4 COMPARACIÓN DE VOLÚMEN DE INDICADOR.....	36
8.5 DEGRADACIÓN DEL INDICADOR EN EL TIEMPO	37
8.6 CONTRIBUCIÓN DEL INDICADOR.....	43
8.7 CONTRIBUCIÓN DEL HgCl ₂	43
8.8 CALIBRACIÓN CON TRIS.....	44
8.9 REPRODUCIBILIDAD.....	45
8.10 PH EN EL ESTERO DE URÍAS, MAZATLÁN.....	46
8.11 REPRODUCIBILIDAD DEL MÉTODO.....	48
9. DISCUSIÓN	48
10. CONCLUSIONES	53

11. TRABAJOS CITADOS	55
12. ANEXOS	58
12.1 METODOLOGÍAS EXPERIMENTALES	58
12.2 TABLAS Y FIGURAS.....	66
12.3 MANUAL DE USO DEL ESPECTROFOTÓMETRO AGILENT8453 PARA LA MEDICIÓN DE PH OCEÁNICO	70

LISTA DE TABLAS

Tabla 1 Rangos de coeficientes de extinción para el m-Cresol púrpura (Dickson et al., 2007)

Tabla 2 Composición de 1 litro de agua marina artificial (AMA2); (Kester et al., 1967).

Tabla 3 Composición de 1 litro de agua marina artificial (AMA3) fórmula propuesta por DeValls & Dickson (1998)(1998)

Tabla 4 Cantidad de sales de TRIS necesarias para obtener medio litro de AMA con pH 7.5, 7.7, 8, 8.3 y 8.5

Tabla 5 Valores de F para la comparación de tratamientos con lámpara UV/Vis y solo Visible con 1 gota de indicador.

Tabla 6 Valores de F: tratamiento con 1 lámpara Visible y comparación de 1, 2 y 3 gotas. Notación: número de gotas-número de lámparas

Tabla 7 Valores de F: tratamiento con 2 lámparas UV/Vis y comparación de 1, 2 y 3 gotas. Notación: número de gotas-número de lámparas

Tabla 8 Diferencia entre los valores de pH ajustados con TRIS y los calibrados a partir de las lecturas

Tabla 9 Valores de pH medidos para cada repetición

Tabla 10 Datos ambientales y de pH en el Estero de Urías

Tabla 11 Valores de pH medido de la muestra 4c

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Equilibrio químico del sistema de CO₂ en el agua de mar. (Fabry et al., 2008; Dickson et al., 2007)

Figura 2 Estructura de meta Cresol Púrpura (m-Cresol Purple)

Figura 3 Lugares de muestreo del Estero de Urías, Mazatlán, Sinaloa

Figura 4 Evolución de la temperatura de la muestra en la celda de vidrio para cada temperatura ambiente. a) 40 °C, b) 35 °C, c) 30 °C, d) 25 °C, e) 20 °C, f) 15 °C y g) 10 °C.

Figura 5 Comparación de los valores de $[I2^-]/[HI^-]$ calculados en periodos de cada 1 minuto por 10 minutos. a) 7.017, b) 7.503, c) 8.157 y d) 8.505

Figura 6 Comparación de los valores de $[I2^-]/[HI^-]$ calculados en periodos de cada 10 minutos, para diferentes pH: a) 7.457, b) 7.927, c) 8.212, d) 8.546 y e) 9.118

Figura 7 Valores de $[I2^-]/[HI^-]$ para mediciones hechas cada hora durante 5 horas. a) 7.457, b) 7.927, c) 8.212, d) 8.546 y e) 9.118

Figura 8 Comparación de valores de $[I2^-]/[HI^-]$ obtenidos en el tiempo cero y después de una semana de almacenamiento de la muestra con indicador a) 7.457, b) 7.927, c) 8.212, d) 8.546 y e) 9.118

Figura 9 Curva de pH contra volumen de m-Cresol, AMA3.2

Figura 10 Curva de pH contra volumen de HgCl₂, AMA3.2 y m-Cresol.

Figura 11 Curva de calibración de pH, valores medidos contra valores de pH ajustados con TRIS.

Figura 12 Valores de pH y OD de cada muestra.

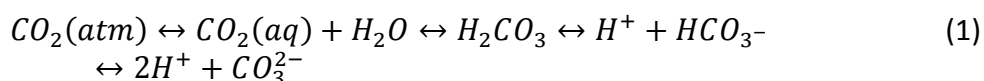
Figura 13 Correlación entre los valores de oxígeno disuelto y los valores de pH.

Resumen

En el presente trabajo se realizaron experimentos para optimizar y calibrar la medición de pH de agua de mar por medio de una técnica espectrofotométrica (uso de celda de flujo o fija, eficiencia del termostato, uso de lámparas, volumen de indicador necesario, degradación del indicador en el tiempo, contribuciones del indicador y $HgCl_2$, calibración con TRIS). Como resultado del trabajo realizado, se estableció un protocolo de medida y análisis que se aplicó a la medida de pH en muestras de agua provenientes del Estero de Urías, Mazatlán, Sinaloa, México. Los valores de pH presentaron un gradiente de pH 7.99 en mar abierto a pH 7.47 en el fondo del estero (incertidumbre de 0.04), que está positivamente correlacionado con las concentraciones de oxígeno disuelto (OD) en el agua. Estas variaciones pueden ser debidas, a la respiración biológica, la degradación de la materia orgánica y a la contaminación antropogénica del estero (Feely et al., 2010).

1. Introducción

Desde que inició la revolución industrial, hace unos 250 años, las emisiones de CO_2 provenientes de las actividades industriales y agrícolas han causado un incremento de la concentración de éste gas en la atmósfera. Este aumento es menor al esperado dado que parte del CO_2 emitido es absorbido por los océanos. Actualmente, se estima que los océanos han absorbido cerca de 450 mil millones de toneladas de dióxido de carbono de la atmósfera, casi un tercio de las emisiones antropogénicas de este gas (Feely et al., 2004; Fabry et al., 2008; Doney et al., 2009). A pesar de que este proceso reduce los niveles de gases de efecto invernadero en la atmósfera y se minimiza el calentamiento global, en los océanos tiene un efecto negativo pues afecta la química acuática y a la biota marina (Fabry et al., 2008). Cuando el CO_2 se disuelve en el agua marina, se forma ácido carbónico, el cual causa alteraciones en el balance químico del agua y reduce tanto el pH como la concentración de iones de carbonato en el agua. La conjunción de estas alteraciones es llamada Acidificación Oceánica - AO (Doney et al., 2009; Caldeira et al., 2003; Oceánica 2009). El ciclo del carbono oceánico se puede resumir de forma breve en las siguientes reacciones de equilibrio químico:



El ciclo es complejo y está gobernado por procesos físicos, biológicos y químicos. El CO_2 de la atmósfera es transferido a los océanos a través de las aguas superficiales por el flujo océano-aire del CO_2 . Este flujo equilibra los niveles de CO_2 en la superficie oceánica con los atmosféricos en un periodo aproximado de un año (Schuster et al., 2009; Doney et al., 2009). Una vez que el $CO_{2(g)}$ se disuelve en el agua, se hidrata y forma ácido carbónico (H_2CO_3) que posteriormente puede disociarse al perder iones de hidrógeno para formar iones de bicarbonato (HCO_3^-) y carbonato (CO_3^{2-}) (Doney et al., 2009). En equilibrio, la concentración de ácido carbónico es

aproximadamente de 1/1000 de la concentración de dióxido de carbono disuelto y no tiene especial importancia en el equilibrio ácido-base debido a que ambos están sin carga (Riebesell et al., 2010).

Para agua superficial con pH cercano a 8.1, aproximadamente un 90% del carbono inorgánico está como iones de bicarbonato, 9% son iones de carbonato y tan solo el 1% corresponde a CO₂ disuelto. Pero cuando se añade CO₂ al agua oceánica, ocurre un incremento en las concentraciones de CO_{2(aq)}, bicarbonato y iones de hidrógeno; éste último causa la disminución del pH (Doney et al., 2009). La reacción del CO₂ con el agua marina reduce también la disponibilidad de los iones carbonato necesarios para la formación y mantenimiento de conchas o esqueletos en organismos marinos y afecta la fisiología ácido-base. De forma general, la AO afecta las tasas de supervivencia de las larvas, y el crecimiento y reproducción de los organismos (Orr et al., 2005; Fabry et al., 2008; Doney et al., 2009; Oceánica 2009). Debido a los efectos de la AO sobre los organismos y ecosistemas acuáticos, así como las pérdidas económicas y poca producción alimentaria que se tiene como consecuencia de la incapacidad de los organismos para desarrollarse adecuadamente, es importante medir y monitorear continuamente el pH marino (Oceánica 2009). Además, el pH es un parámetro físico importante, pues refleja el estado termodinámico de los diferentes estados de los sistemas ácido-base presentes en el agua marina (Dickson A. G., 1993)

El pH puede medirse en agua de mar con electrodos o mediante espectrofotometría. Las limitaciones principales del uso de electrodos son: falta de exactitud, falta de electrodos con suficiente sensibilidad, interferencia electromagnética, que no se pueden relacionar las mediciones con estados estándar de termodinámica del hidrógeno y que las mediciones no son fácilmente comparables (Dickson A. G., 1993). Debido a esto, no se pueden establecer de forma rigurosa tendencias temporales de los cambios del pH oceánico. Como alternativa a la medición con electrodos se dispone de la espectrofotometría de luz visible. Con este método es posible hacer mediciones con alta exactitud y confiabilidad. Además, se trata de una técnica simple, tiene una tasa de consumo de indicador baja, no necesita de un estándar para la calibración y pueden realizarse gran cantidad de lecturas en poco tiempo (Dickson A. G., 1993; Responses to EPA, n.d.; Bellerby et al., 1995). Es por ello que en este trabajo optimizamos un método espectrofotométrico para realizar mediciones de pH con el fin de poder realizar mediciones en agua de mar del Estero de Urías y para que posteriormente el método desarrollado pueda ser utilizado en estudios subsecuentes de zonas costeras o en mar abierto.

2. Antecedentes

2.1 Acidificación oceánica

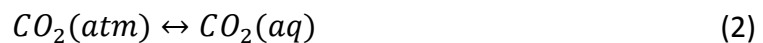
La acidificación oceánica es la disminución del pH del océano debido a un incremento en la concentración de dióxido de carbono atmosférico de origen antropogénico (Ries et al., 2009; Doney et al., 2009). Desde el inicio de la revolución industrial, a mediados del siglo XVIII, la liberación de CO₂ proveniente de actividades industriales y agrícolas,

quema de combustibles fósiles y deforestación han incrementado la concentración de CO₂ atmosférico de 280 a unas 400 partes por millón (ppm). El 50% de estas emisiones ocurrió en las últimas tres décadas con una tasa de 0.5% por año (Responses to EPA, n.d.; Feely et al., 2009; Fabry et al., 2008; Doney et al., 2009). Actualmente la concentración de CO₂ es más alta que la registrada en el planeta en los últimos 800,000 años y se espera que continúe incrementando en las próximas décadas contribuyendo así al calentamiento global, aumento del nivel del mar y un desbalance en el intercambio de CO₂ entre la tierra y el mar que trae como consecuencia la acidificación oceánica (Responses to EPA, n.d.; Fabry et al., 2008; Brewer, 1997).

El aumento de CO₂ en la atmósfera se ha visto amortiguado por el océano, que funciona como el sumidero más grande para este gas y que ya ha absorbido alrededor de un 30% de los gases emitidos a la atmósfera es decir, más de 450 mil millones de toneladas de CO₂ (Responses to EPA, n.d.; Doney et al., 2009; Brewer, 1997). Si este sumidero de gas por parte del océano no existiera, la concentración de CO₂ en la atmósfera sería 55% más alta que la observada actualmente (Fabry et al., 2008). A pesar de que este amortiguamiento puede tomarse como una ventaja porque el calentamiento global se ve atenuado, el dióxido de carbono diluido en el agua afecta las propiedades químicas de los océanos causando alteraciones en el pH y en los balances químicos fundamentales y como consecuencia, la biota marina se ve afectada (Doney et al., 2009; Fabry et al., 2008; Brewer, 1997).

2.2 La química del carbonato en el agua marina

El sistema del carbono inorgánico es uno de los más importantes para el equilibrio químico de los océanos y es en gran medida el responsable de controlar el pH del agua marina. Feely et al. (2009) explica las reacciones relacionadas con la química oceánica del carbonato y se pueden dividir en: reacciones abióticas (disolución del CO₂ y la química ácido-base) y reacciones bióticas (la precipitación y disolución del CaCO₃, la fotosíntesis y la respiración). En la Figura 1 se muestra un esquema de las reacciones que ocurren cuando el CO₂ se disuelve en el agua. La primera reacción ocurre cuando el CO₂ se disuelve en el agua:



El intercambio gaseoso entre la interfase agua-océano equilibra el CO₂ del agua superficial con los niveles atmosféricos en una escala de tiempo de meses a un año, por tanto, en la mayoría de las regiones oceánicas la concentración de CO₂ aumenta proporcionalmente a la concentración de CO₂ de la atmósfera (Feely et al., 2009; Doney et al., 2009). La segunda reacción es la hidratación del CO₂ para formar ácido carbónico (H₂CO₃), que se disocia en un ion de hidrógeno (H⁺) y bicarbonato (HCO₃⁻), ese ion de hidrógeno entonces puede interactuar con un CO₃²⁻ para formar un bicarbonato:



Estas reacciones son reversibles cerca del equilibrio (pH de ~8.1 para agua superficial) y muy rápidas, ocurren en décimas de segundo para la hidratación del CO₂ y en microsegundos para las reacciones ácido-base. Para las condiciones típicas de agua oceánica el 88~ 90% del carbono inorgánico disuelto (DIC) está como iones de bicarbonato (HCO₃⁻), 9~ 11% como iones de carbonato (CO₃²⁻) y solamente el 0.5~ 1% queda como CO_{2(aq)} disuelto y H₂CO₃ (Feely et al., 2009; Fabry et al., 2008; Doney et al., 2009). La tercera reacción es la formación y disolución de minerales de carbonato de calcio sólidos (CaCO_{3(s)}) y de ella depende la capacidad del océano de absorber el dióxido de carbono atmosférico (Doney et al. 2009):



La última reacción es la fotosíntesis y la respiración/descomposición:



Como resultado, el efecto neto de añadir CO₂ al agua marina resulta en un incremento de las concentraciones de H₂CO₃, HCO₃⁻ (aumento de AT) y iones H⁺ (reducción del pH) y disminuye la concentración de CO₃²⁻ y los estados de saturación de los minerales de carbonato de calcio (CaCO₃), calcita (Ω_{ca}) y aragonita (Ω_{ar}) (Institution, 2012; Responses to EPA, n.d.; Fabry et al., 2008; Feely et al., 2009). En resumen, se está añadiendo un ácido débil (ácido carbónico) al océano alcalino. Por definición, solo los ácidos que son más fuertes que el ácido carbónico son los que pueden afectar la alcalinidad del agua marina así que no se pueden observar cambios en ésta sino, hasta que se comienza a disolver el CaCO₃ sólido en el suelo marino superficial (Brewer, 1997).

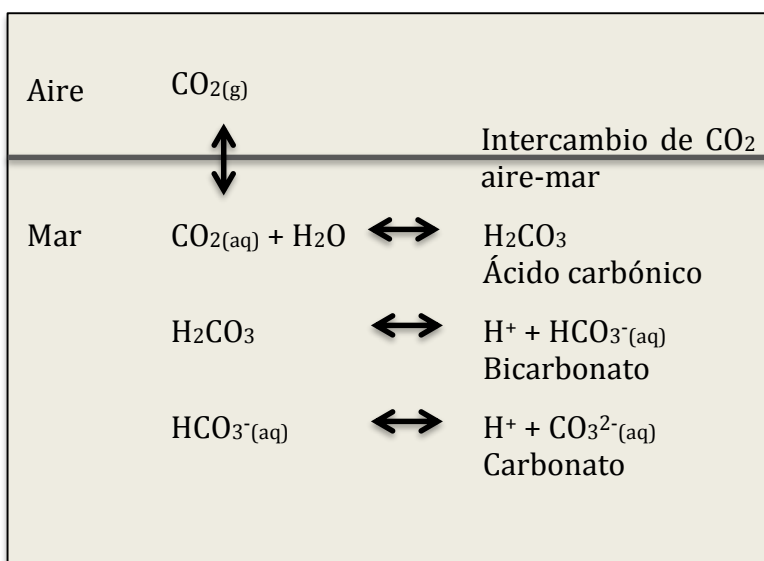
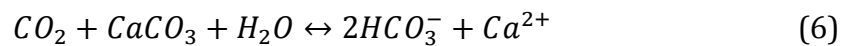


Figura 1 Equilibrio químico del sistema de CO₂ en el agua de mar. (Fabry et al., 2008; Dickson et al., 2007)

2.3 Sistema de carbono inorgánico en el océano

La capacidad del océano de absorber CO_2 atmosférico depende de la disolución del CaCO_3 en la columna de agua o sedimentos y también de las interacciones de los carbonatos marinos con el CO_2 (Feely et al., 2009):



El CaCO_3 mineral proviene de conchas y esqueletos de organismos marinos, incluyendo el plancton, corales, algas coralinas y otros invertebrados. Las tasas de formación y disolución de CaCO_3 dependen del estado de saturación (Ω), que se define como el producto iónico de las concentraciones de iones de calcio y carbonato (Doney et al. 2009).

$$\Omega = \frac{[\text{Ca}^{2+}][\text{CO}_3^{2-}]}{K'_{sp}} \quad (7)$$

El producto de solubilidad estequiométrico K'_{sp} depende de la temperatura, salinidad, presión y de la fase mineral particular; la aragonita es aproximadamente 50% más soluble que la calcita porque $[\text{Ca}^{2+}]$ es cercanamente proporcional a la salinidad, Ω esta ampliamente determinado por variaciones en $[\text{CO}_3^{2-}]$, que puede ser calculado desde DIC y los datos de AT (Doney et al., 2009; Fabry et al., 2008).

2.3.1 Interacción CO_2 – CaCO_3

La disolución de carbonatos marinos, calcitas magnesianas biogénicas (de algas coralinas), aragonita (de corales y pterópodos) y calcita (de cocolitofóridos y foraminíferos) neutralizan el CO_2 antropogénico y aumentan la AT por medio de la reacción (6) (Feely et al., 2004). Estas reacciones ocasionan que el carbonato de calcio no se encuentre más en esa forma sino, en bicarbonato y iones de calcio lo que causa un aumento en la AT del océano y así, se promueve la capacidad de absorción de CO_2 proveniente de la atmósfera (Feely et al., 2009).

Las zonas en las que la disolución del CaCO_3 se lleva a cabo también se ven afectadas debido a que el estado de saturación del carbonato de calcio disminuye lo que causa que la localización y cantidad de disolución aumenten. Aproximadamente entre el 60%– 80% del carbonato que se disuelve, lo hace en los primeros 1000m de profundidad y alrededor del 30% del CaCO_3 que se produce anualmente es enterrado en sedimentos superficiales y profundos (Feely et al., 2004). Los estados de saturación del CaCO_3 son más altos en zonas bajas con aguas tropicales tibias y son más bajos en aguas de latitudes altas y en las profundidades, lo que indica que existe un incremento en la solubilidad del CaCO_3 a medida que disminuye la temperatura y se incrementa la

presión (Doney et al., 2009). La disolución de las partículas de CaCO_3 aumentará a medida que las aguas aumenten su nivel de insaturación (Feely et al., 2004).

2.3.2 El estado de saturación

El estado de saturación del agua marina describe el grado de saturación o insaturación del agua marina con respecto a la aragonita y la calcita (Ω_{arg} o Ω_{cal}) es el producto iónico de las concentraciones de iones de calcio y carbonato, la temperatura in situ, salinidad y presión divididos por el producto de solubilidad estequiométrico K'_{sp} (ecuación (7)). La concentración de calcio se estima a partir de la salinidad y la concentración de iones carbonato y se calcula desde DIC y AT (Feely et al., 2004; Doney et al., 2009).

En regiones en que Ω_{arg} o Ω_{cal} son > 1.0 la formación de conchas y esqueletos se favorece; para valores < 1.0 el agua de mar se vuelve corrosiva para el CaCO_3 y en ausencia de mecanismos de protección de los organismos (capas orgánicas), la disolución comienza (Fabry et al., 2008; Doney et al., 2009). La reacción que ocurre cuando se disuelve el CO_2 en el agua causa una reducción en las concentraciones de CO_3^{2-} que conlleva una disminución en el estado de saturación del CaCO_3 es decir, la disponibilidad de los iones de carbonato necesarios para los organismos calcificadores se ve reducida y esto causa que la habilidad de secretar CaCO_3 para la formación de conchas y exoesqueletos de organismos planctónicos como cocolitofóridos y pterópodos y de invertebrados como corales, moluscos, equinodermos y crustáceos se vea comprometida (Fabry et al., 2008; Feely et al., 2009).

3. Efectos de la acidificación

Los cambios en la química acuática, afectan a los organismos que los habitan, los ciclos biogeoquímicos y en la tasa de intercambio gaseoso entre la atmósfera y el océano. El aumento en las concentraciones de CO_2 en la atmósfera causa que el gas se disuelva en la superficie oceánica y posteriormente sea llevado a aguas más profundas, con los siguientes problemas: aumento en los niveles totales de CO_2 , aumento en las temperaturas de la superficie oceánica, incremento en el nivel del mar y disminución en el pH oceánico, responsable de la acidificación de los océanos que reduce la disponibilidad de los iones de carbonato necesarios para que los organismos calcificadores tales como: calcificadores planctónicos, corales, algas coralinas, moluscos, equinodermos, crustáceos y pterópodos formen sus conchas y esqueletos (Anthony et al., 2008; Fabry et al., 2008; Doney et al., 2009; Orr et al., 2005; Ries et al., 2009; Brewer, 1997).

3.1 Efectos en los organismos

La secreción de estructuras esqueléticas de CaCO_3 está extendida en los phyla animales y tuvo eventos evolutivos independientes y repetidos a lo largo del tiempo geológico desde el periodo Precámbrico tardío. Una de las probables ventajas que se tienen con los esqueletos calcáreos es la protección (Fabry et al., 2008). Algunos organismos producen una capa orgánica que separa sus conchas y esqueletos del agua marina ambiental y esto les provee una mayor resiliencia a los niveles elevados de pCO_2 que la de aquellos que producen conchas y esqueletos que están directamente expuestos al agua de mar (Ries et al., 2009).

El grado de sobresaturación tiene un efecto importante en las tasas de calcificación de las especies y comunidades en los hábitats planctónicos y benthicos. La tasa de calcificación de todos los organismos calcificadores (con algunas excepciones) disminuye como respuesta al incremento de pCO_2 y a la disminución del estado de saturación del CaCO_3 , $[\text{CO}_3^{2-}]$ y pH lo que consecuentemente afecta la adecuación (fitness) y supervivencia de los mismos por tanto, algunas especies pueden experimentar cambios en su distribución y eventualmente ser reemplazados por organismos no calcificadores u otras especies que no sean sensibles a los niveles elevados de pCO_2 (Feely et al., 2004; Fabry et al., 2008).

Por otro lado, hay organismos calcificadores que presentan un cierto grado de control sobre la biomineralización que generalmente implica el movimiento activo y pasivo de iones dentro y fuera de un compartimento de calcificación que está aislado del agua marina ambiental (Doney et al., 2009). La medida en que éstos organismos son afectados depende del estado de saturación (Ω) del CaCO_3 que suele expresarse por los grados de saturación de los biominerales aragonita y calcita, y de la especie de la que se trate ya que se ha demostrado que en los organismos calcificadores existe una calcificación reducida cuando los niveles de pCO_2 se incrementan y se reducen los de $[\text{CO}_3^{2-}]$ (Feely et al., 2009; Fabry et al., 2008). Algunos taxa que tienen al agua marina como su fluido calcificador presentan niveles de calcificación mejorados cuando los niveles de pCO_2 son más altos ya que la concentración de carbono inorgánico disuelto (DIC) aumenta (Doney et al., 2009; Ries et al., 2009).

El decremento en el pH del agua de mar que ocurrirá con el aumento previsto de pCO_2 antropogénico va a reducir el $[\text{CO}_3^{2-}]$ en el agua con lo que la calcificación de muchos organismos se verá inhibida y tal vez cause la disolución de las conchas y esqueletos ya existentes, afecte las redes de alimentación y el ciclo del carbono a través de controles de abajo hacia arriba que toman en cuenta la especiación dependiente de pH, de nutrientes y metales que afectan la biodiversidad y las tasas de producción primaria (Ries et al., 2009; Fabry et al., 2008). A continuación se hace una descripción de los efectos que tiene la AO sobre diferentes grupos de organismos.

3.1.1 Fitoplancton y cianobacterias

Muchas especies de fitoplancton marino pueden utilizar el CO_2 disuelto y el HCO_3^- durante la fotosíntesis y debido a la abundancia de HCO_3^- en el agua marina, su

crecimiento generalmente no está limitado por el carbono. Algunos estudios sugieren que el consumo de CO₂ por parte del fitoplancton aumenta bajo una elevada pCO₂ (Responses to EPA, n.d.). Por otro lado, el calentamiento global que acompaña la acidificación oceánica incrementa la estratificación termal del océano superior por lo que reduce la surgencia de nutrientes y ha sido relacionado con decrementos de biomasa y productividad de fitoplancton en una escala global (Doney et al., 2009; Responses to EPA, n.d.). Las cianobacterias fijadoras de nitrógeno del género *Trichodesmium*, que son responsables de una gran parte de la productividad primaria en zonas pobres en nutrientes como las aguas cálidas de las zonas tropicales y subtropicales, muestran un incremento en las tasas de fijación de nitrógeno y carbono en ambientes con una elevada pCO₂ (Responses to EPA, n.d.).

3.1.2 Algas coralinas crustosas (CCA)

Las CCA se encuentran distribuidas alrededor del mundo y son unos de los organismos fotosintéticos que habitan más profundo en los océanos y secretan esqueletos de calcita con alto contenido de Mg que, dependiendo del contenido de Mg, es típicamente más soluble que la aragonita (Responses to EPA, n.d.).

3.1.2.1. Supervivencia

Las CCA constructoras de arrecifes tropicales presentan un decremento en la producción y calcificación como respuesta a la AO (Responses to EPA, n.d.).

Incremento de la sensibilidad a la temperatura.- Las algas presentan una pérdida de pigmentación que es más sensible al calentamiento cuando el pH disminuye (Anthony et al., 2008). La abundancia de algas coralinas disminuye rápidamente cuando se acercan a aguas bajas cercanas a la ventilación (vent) del CO₂ submarino lo que sugiere que las algas coralinas no podrían sobrevivir en las aguas con pH bajos cercanas a la ventilación (Responses to EPA, n.d.)

3.1.2.2. Crecimiento

Productividad.- La dosificación de CO₂ causa una reducción dramática en la productividad diaria pues la acidificación afecta la tasa neta de fotosíntesis y está exacerbada por el calentamiento (Anthony et al., 2008). Relativo a la producción neta con pH normal (8.0-8.4), la producción neta a niveles de pH de 7.85-7.95 y 7.6-7.7 disminuye en un 50% y 100%, respectivamente (Responses to EPA, n.d.).

Tasas de calcificación más lentas y tasas de disolución de esqueleto más altas.- Las CCA pueden ser más sensibles a la acidificación debido a que sus esqueletos tienen calcita con alto contenido de Mg y varios estudios han encontrado que las CCA reducen su superficie de 25% a 4% y pueden llegar a disolverse completamente en ambientes que han sido enriquecidos con CO₂ además, esa respuesta puede verse acelerada si se incrementa la temperatura (Responses to EPA, n.d.).

3.1.2.3. Reproducción y reclutamiento

Se ha encontrado que las tasas de reclutamiento en condiciones acidificadas (365ppm de CO₂ más altas que las condiciones sin tratamiento) se redujeron en un 72% (Responses to EPA, n.d.). Un declive en la abundancia de CCA puede tener

consecuencias ecológicas importantes debidas al rol que juegan en los arrecifes de coral. Las CCA son un sitio de asentamiento para las larvas de invertebrados incluyendo corales y contribuyen significativamente a la acreción y cementación del arrecife (Anthony et al., 2008).

3.1.3 Pastos marinos Clase Liliopsida, Orden Alismatales, Familia Cymodoceaceae, Hydrocharitaceae, Pisidoniaceae y Zosteraceae

Los pastos marinos son uno de los ecosistemas más ricos biológicamente y más productivos de los océanos, fungen como criadero para los peces juveniles y son un hábitat importante para peces adultos, invertebrados y moluscos. Además, son una importante fuente de alimentación para especies amenazadas de la Clase Mammalia, Orden Sirenia (dugongos y manatíes) y Clase Reptilia, Orden Testudines, Familia Cheloniidae (tortugas marinas) (Responses to EPA, n.d.). Los pastos marinos son un componente crítico para la manutención de la biodiversidad en los océanos y pueden ser uno de los pocos ecosistemas capaces de beneficiarse del incremento de los niveles de CO₂ en el agua marina (Responses to EPA, n.d.). Son capaces de deshidratar y utilizar el HCO₃⁻ (Doney et al., 2009). Los pastos expuestos a un ambiente enriquecido con CO₂(aq) incrementan su biomasa, rendimiento reproductivo, tasa fotosintética y reducen sus requerimientos de luz, lo que sugiere que puede aumentar su productividad potencialmente en ambientes con condiciones altas en CO₂(Responses to EPA, n.d.; Doney et al., 2009). Sin embargo, los beneficios de un agua enriquecida con CO₂ pueden ser contrarrestados con un incremento en la temperatura que afecta negativamente el crecimiento vegetativo (Responses to EPA, n.d.; Doney et al., 2009).

3.1.4 Calcificadores planctónicos, cocolitos, Phylum Foraminífera y Phylum Mollusca

Los mayores grupos planctónicos productores de carbonato de calcio son los cocolitofóridos, foraminíferos y pterópodos conchados que son los mayores formadores de aragonita (Fabry et al., 2008; Orr et al., 2005; Responses to EPA, n.d.). Estos tres grupos son los que llevan casi todo el carbonato de calcio de las partes superiores del océano a las profundidades (Fabry et al., 2008; Responses to EPA, n.d.). Los cocolitofóridos y foraminíferos secretan testas y conchas hechas de calcita mientras que los pterópodos forman conchas de aragonita (que es ~50% más soluble en agua que la calcita) (Responses to EPA, n.d.; Doney et al., 2009; Orr et al., 2005; Fabry et al., 2008).

3.1.4.1. Supervivencia y crecimiento

La respuesta de la tasa de calcificación de los cocolitofóridos presenta un decremento de -25% a -66% cuando el pCO₂ es incrementado de 560- 840µatm (Feely et al., 2004; Doney et al., 2009; Responses to EPA, n.d.). Sin embargo, no se han encontrado respuestas uniformes en la tasa de calcificación al incremento de CO₂ y disminución

de pH del agua de mar y al menos una especie ha presentado la capacidad de adaptarse a un $p\text{CO}_2$ cambiante en largos periodos de tiempo (Responses to EPA, n.d.; Doney et al., 2009).

3.1.4.2. Phylum Foraminifera

En los foraminíferos se encontró que la disolución de la cocha se incrementa a medida que la concentración de iones de carbonato disminuye (Doney et al., 2009). El crecimiento de la concha es críticamente promovido por un elevado pH y concentración de CO_3^{2-} en el microambiente inmediatamente adyacente a la concha (Fabry et al., 2008). Si las densidades de foraminíferos disminuyen en las regiones de latitudes altas, la exportación de CaCO_3 al interior del océano se verá reducida lo que sucesivamente disminuirá su potencial para actuar como lastre en el transporte de carbono orgánico hacia el océano profundo (Fabry et al., 2008).

3.1.4.3. Phylum Mollusca, Clase Gastropoda, Subclase Opisthobranchia, Orden

Thecosomata

Los pterópodos son importantes componentes del plancton en los sistemas de latitudes altas que requieren de agua marina sobresaturada con respecto a la aragonita, tienen altas densidades poblacionales en aguas polares y subpolares que pueden alcanzar los miles de individuos por m^3 , se encuentran en los primeros 300 metros de la columna de agua, y son presas de una gran variedad de zooplancton y peces depredadores (Orr et al., 2005; Responses to EPA, n.d.; Doney et al., 2009).

Si el agua se insatura entonces su hábitat se hará cada vez más limitado, primero dentro de la columna de agua interrumpiendo la migración vertical debido a la disminución de la profundidad del horizonte de saturación de la aragonita y después, latitudinalmente llevándolos a aguas superficiales de latitudes menores que permanecen supersaturadas con respecto a la aragonita (Orr et al., 2005). En el caso de que las aguas superficiales lleguen a estar insaturadas con respecto a la aragonita es probable que los pterópodos no sean capaces de mantener sus conchas ya que éstas se comienzan a disolver rápidamente en cuanto se encuentran en condiciones donde la saturación del agua con respecto a aragonita es forzada a $\Omega < 1.0$ y es posible que los pterópodos sean eventualmente eliminados de esas regiones, lo cual impactaría procesos ecosistémicos como a) el flujo hacia abajo de carbón orgánico que causará la remoción de las mayores fuentes de CaCO_3 , b) la dinámica de la red alimenticia y c) las distribuciones de los depredadores especializados de pterópodos (Doney et al., 2009; Orr et al., 2005; Fabry et al., 2008; Responses to EPA, n.d.).

3.1.5 Corales Phylum Cnidaria, Clase Anthozoa, subclase Zoantharia, Orden Zoanthidea

Los ecosistemas de arrecifes de coral usualmente se encuentran en profundidades de 10 a 30 metros siendo el hogar de una gran biodiversidad marina y se caracterizan por la habilidad que tienen de producir un excedente de CaCO_3 que ayuda a construir

la estructura del arrecife y se correlaciona con una variedad de componentes del sistema de carbonatos del agua marina (alcalinidad, pCO_2 y estado de saturación) (Doney et al., 2009). Actualmente las tasas de calcificación de éstas comunidades están viéndose disminuidas por el aumento del CO_2 atmosférico que por un lado incrementa las temperaturas de la superficie oceánica y causa el blanqueamiento de los corales y, por el otro disminuye el pH oceánico y compromete la acreción de carbonatos causando que las estructuras arrecifales se contraigan y las tasas de disolución se incrementen (Anthony et al., 2008; Doney et al., 2009).

3.1.5.1. Supervivencia

Tasas de calcificación.- Los corales tienen tasas de calcificación que varían ampliamente dependiendo de los cambios de pH y del estado de saturación de la aragonita (Doney et al., 2009). Se ha visto que pueden llegar a perder completamente sus esqueletos en aguas muy ácidas, pero los recuperan con agua a pH normal (~ 8) (Doney et al., 2009). Estudios recientes indican que la supervivencia de los corales y el crecimiento de sus esqueletos se ven afectados negativamente así como también su habilidad para competir por espacio y resistir fuerzas erosivas e hidrodinámicas, las propiedades de propagación de luz del esqueleto para la fotosíntesis, la tasa de fragmentación aumenta, la edad de madurez sexual se retarda y por lo tanto se altera la producción de gametos y el desarrollo larval y en general, la adecuación (fitness) de los organismos cambia debido a la pérdida del esqueleto inducida por la AO (Responses to EPA, n.d.; Doney, Fabry, Feely, & Kleypas, 2009).

Incremento de la sensibilidad a la temperatura.- Junto con el aumento de las temperaturas oceánicas, la AO puede tener un impacto adicional en las tasas de supervivencia pues ha sido probado que la temperatura es un factor fundamental en el blanqueamiento de los corales (Responses to EPA, n.d.)

Incremento en las tasas de bioerosión.- Las tasas de bioerosión de los esqueletos de los corales por algas euendolíticas se incrementa cuando el pH disminuye (Responses to EPA, n.d.)

Pérdida de hábitat.- La supervivencia de los corales se verá afectada si las estructuras coralinas en vez de construirse comienzan a destruirse (Responses to EPA, n.d.)

3.1.5.2. Crecimiento

El decremento en el crecimiento esquelético de los corales formadores de arrecifes es una consecuencia de AO y en promedio, el doble de los valores de CO_2 atmosférico preindustriales resulta en un decremento en la tasa de calcificación de 10 a 50% (Responses to EPA, n.d.).

3.1.5.3. Reproducción y reclutamiento

La AO tiene respuestas en la producción de gametos, las tasas de fertilización, el asentamiento de las larvas y el crecimiento posterior al asentamiento. Según los estudios citados por la EPA (n.d.) la producción de gametos y el reclutamiento no se vieron afectados. En cuanto al asentamiento y el crecimiento posterior al asentamiento, se encontró que el asentamiento no es diferente entre los tratamientos con diferentes concentraciones de pH (380, 560 y 720 ppm) pero el crecimiento sí

disminuyo de 50% a 78% en los tratamientos de 560ppm y 720ppm respectivamente (Responses to EPA, n.d.).

3.1.6 Corales de aguas profundas y montículos de carbonato Phylum Cnidaria, Clase Anthozoa, subclase Zoantharia, Orden Scleractinia

Los corales escleractínios de aguas profundas se encuentran en aguas de 200 a 1000 metros, crecen muy lentamente pudiendo llegar a vivir más de 1500 años y constituyen un hábitat que soporta gran biodiversidad y pesquerías. Aparentemente, la profundidad máxima en la que habitan estos corales aragoníticos se relaciona con el horizonte de saturación de la aragonita. Las comunidades profundas experimentar ían una contracción en su distribución respecto a la profundidad debido a la insaturación del medio (Doney et al., 2009).

3.1.7 Invertebrados bénticos Phylum Arthropoda, Phylum Echinodermata y Phylum Mollusca

La aparición de partes duras de esqueletos calcáreos está extendida entre varios phyla (alrededor de 9) de invertebrados bénticos que secretan carbonato de calcio en diversas formas (aragonita, calcita, calcita con alto contenido de Mg (>5 moles % $MgCO_3$), carbonato de calcio amorfo, o una mezcla de ellos). Estos Phyla son importantes para las comunidades cercanas a la costa, así como también lo son económica y ecológicamente por ejemplo, para las pesquerías y fungiendo como ingenieros de los ecosistemas costeros proveyendo de hábitat y servicios ambientales para gran variedad de organismos (Responses to EPA, n.d.; Doney et al., 2009; Fabry et al., 2008).

3.1.7.1. Supervivencia y crecimiento

En etapas tempranas de calcificación de los moluscos bénticos y equinodermos se ha encontrado una fuerte respuesta al incremento de pCO_2 en el agua marina y al decremento del pH, concentración iónica de carbonato y al estado de saturación del carbonato de calcio (Fabry et al., 2008; Responses to EPA, n.d.). Por ejemplo, se ha encontrado que en ambientes con pCO_2 elevado los artrópodos, moluscos y equinodermos pueden llegar a presentar decrementos en las tasas de calcificación de 10 a 25% y a una disminución en el crecimiento de la concha y en el peso húmedo (Responses to EPA, n.d.; Fabry et al., 2008). Además, se sabe que los bivalvos, equinoideos y algunos crustáceos son sensibles a la acidificación interna de los fluidos corporales y utilizan la disolución de la concha para soportar la regulación acido-base de un alto pCO_2 (Doney et al., 2009; Responses to EPA, n.d.).

3.1.7.2. Reproducción y reclutamiento

En equinoideos se ha encontrado que cuando se incrementa la concentración de CO_2 ocurre una disminución en el éxito de fertilización, tasas de desarrollo y tamaño larval así como también una biomineralización anormal de las espículas de las larvas

(Responses to EPA, n.d.; Fabry et al., 2008). También se ha encontrado que los juveniles de bivalvos *Mercenaria mercenaria* recién asentados presentan una disolución de la concha sustancial, malformaciones en la concha o la concha permanece no mineralizada, y presentan una mayor mortalidad cuando son introducidos en sedimentos superficiales que están insaturados con respecto a la aragonita (Responses to EPA, n.d.; Doney et al., 2009; Fabry et al., 2008). La mineralogía y mecanismos de calcificación de los estados larvales de moluscos y equinodermos puede que los haga particularmente sensibles a la AO (Fabry et al., 2008). En el caso de los organismos que acretan una concha o esqueleto que permanece cubierto por una capa orgánica externa por ejemplo, corales de aguas templadas, algas coralinas rojas, algas verdes calcáreas, crustáceos y equinoideos. Estos exhiben una mayor resiliencia a una elevada $p\text{CO}_2$ que aquellos organismos que producen conchas y esqueletos que están expuestos al agua marina ambiental después de la deposición. Por ejemplo, anélidos serpúlidos, gasterópodos (Littorinidae, Patellidae y Buccinidae) y bivalvos (Ries et al., 2009).

3.2 Cambios en la estructura de las comunidades y los enlaces tróficos marinos

Las disminuciones en los niveles de calcificación para cualquier organismo pueden comprometer su adecuación (fitness), reducir su edad de madurez sexual, flotabilidad, habilidad para competir con organismos no calcificadores dándole una ventaja competitiva a éstos los últimos, y se producen cambios en el comportamiento de la luz en la columna de agua; cada una de estas modificaciones pueden afectar la dinámica de las comunidades en formas complejas (Doney et al., 2009; Fabry et al., 2008). El éxito reproductivo y los estados tempranos de desarrollo de varias especies son particularmente sensibles a los niveles elevados de $p\text{CO}_2$ lo que puede impactar las tasas de reclutamiento y las abundancias y distribuciones de los organismos (Fabry et al., 2008) y como consecuencia afecta la estructura de las comunidades. Por otro lado, el incremento continuo de CO_2 antropogénico puede aumentar la fijación de nitrógeno atmosférico y la productividad total primaria en aguas templadas y pobres en nutrientes de las regiones tropicales y subtropicales (Responses to EPA, n.d.).

3.3 Cambios biogeoquímicos

En los últimos 250 años la producción de CO_2 de origen antropogénico ha sido tan grande que ha causado cambios en las propiedades físicas del agua marina y del agua dulce (Brewer, 1997). Hoy en día los océanos constituyen el mayor sumidero de CO_2 , lo que ha causado cambios en la química acuática como: la acidificación oceánica, cambios en la cantidad de CaCO_3 , modificaciones en la dinámica biogeoquímica del carbono y los nutrientes, cambios en los horizontes de saturación de la calcita y aragonita, disminución del sumidero oceánico (Brewer, 1997; Doney et al., 2009; Orr, et al., 2005; Responses to EPA, n.d.; Feely et al., 2004; Le Quéré et al., 2010).

3.3.1 Cantidad de CaCO_3

Cerca del 50% ~ 71% del CaCO_3 producido se disuelve en la columna de agua superior por lo que del CaCO_3 total que se produce anualmente, alrededor del 30% es enterrado en los sedimentos superficiales y profundos y el resto se disuelve en la columna de agua, en la interfase agua-sedimentos o en la porción superior de la columna sedimentaria (Feely et al., 2004). El CaCO_3 juega un papel decisivo en la regulación de la absorción de carbono por parte de los océanos (Feely et al., 2004).

Debido a que la AO disminuye el estado de saturación de CaCO_3 e incrementa sus tasas de disolución, causa que el perfil de alcalinidad sea más uniforme con la profundidad y con esto, que la capacidad de los océanos de absorber más CO_2 de la atmósfera se incremente (Doney et al., 2009; Feely et al., 2004; Orr et al., 2005). Si los procesos que regulan el transporte de carbono orgánico e inorgánico al océano profundo se desajustan, entonces disminuiría la producción de CaCO_3 , lo que aumentaría la disolución del CaCO_3 de los sedimentos, aumentando el pH oceánico y por lo tanto su capacidad de almacenar CO_2 (Feely et al., 2004). Por otro lado, si los procesos están ajustados por ejemplo, con el lastrado de materia orgánica por parte del CaCO_3 , entonces una reducción en la producción de carbonato resultaría en una remineralización superficial del carbono orgánico y disminuiría la importancia de los sedimentos en la amortiguación del incremento de CO_2 atmosférico (Feely et al., 2004). Es probable que la absorción de CO_2 atmosférico llegue a un límite en el que pueda fatigar los mecanismos naturales de amortiguación del océano y con esto, que la eficiencia del océano para absorber carbono disminuya con el tiempo (Doney et al., 2009).

3.3.2 Ciclo del carbono y los nutrientes

El incremento de la disolución del carbonato en la columna de agua causa una disminución en la contribución del CaCO_3 al lastrado de carbono inorgánico hacia el océano profundo causando que más carbono orgánico se remineralice en aguas someras y disminuya la eficiencia de absorción de CO_2 de los océanos. En cuanto a la fijación del nitrógeno, las tasas de fijación altas con elevado CO_2 pueden proveer de nitrógeno adicional a regiones subtropicales bajas en nutrientes, donde se esperaría que la producción primaria disminuyera debido al incremento de la estratificación vertical y la reducción de la aportación vertical de nutrientes desde abajo (Doney et al., 2009).

3.3.3 Especiación química en el agua de mar

La AO tendrá amplias alteraciones en la química orgánica e inorgánica del agua de mar. Por ejemplo, las especies ácidas débiles que participan en reacciones ácido-base sufrirán cambios en la especiación con la disminución del pH (por ejemplo, boro,

fósforo, sílice, nitrógeno y elementos traza como el hierro, zinc, vanadio, arsénico y cromo). Otros elementos que serán afectados por la disminución del pH son los complejos metálicos orgánicos y la materia orgánica disuelta que sufre reacciones de hidrólisis en el agua de mar, por ejemplo ácidos orgánicos, amino ácidos, ácidos nucleicos, proteínas, materiales húmicos (Doney et al., 2009).

3.3.4 Estado de saturación de la calcita y aragonita

La solubilidad del CaCO_3 se incrementa cuando la temperatura disminuye y la presión aumenta, por lo que los estados de saturación son generalmente más altos en los trópicos y más bajos en latitudes altas (Fabry et al., 2008). En las aguas frías de latitudes altas la insaturación de la aragonita y calcita ocurren cuando los valores de $p\text{CO}_2$ alcanzan 1200 y 1900 μatm , respectivamente, mientras que en las aguas tropicales y subtropicales ocurre cuando la $p\text{CO}_2$ alcanza 1700 y 2800 μatm , respectivamente (Feely et al., 2004). Si la tendencia en emisiones de CO_2 antropogénico continua por cientos de años más, se podría esperar que se alcance el estado de insaturación en las zonas polares sin embargo, es poco probable que ocurra en las zonas tropicales y sub tropicales aunque, en algunas regiones asociadas a las surgencias, la disminución de profundidad del horizonte de saturación de la aragonita ya esta afectando negativamente a varios animales pelágicos (Feely et al., 2004; Fabry et al., 2008).

3.3.5 Diferencias de los horizontes de saturación de la calcita y aragonita entre océanos

El pH y el CO_3^{2-} disminuyen rápidamente en las aguas superficiales debido a la liberación de CO_2 por la circulación y el proceso de respiración. Además, el pH superficial oceánico, la concentración de iones de carbonato y la saturación del carbonato de calcio exhiben importantes diferencias geográficas entre los polos y los trópicos y entre los océanos (Responses to EPA, n.d.; Feely et al., 2009). En las aguas polares el estado de saturación de la aragonita es más bajo, cercano a 1, el umbral entre insaturado (<1) y sobresaturado (>1) (Responses to EPA, n.d.). En el Océano Atlántico subtropical del este, la aragonita alcanza el estado de insaturación entre los 400 – 1000m de profundidad mientras que en el resto del Océano Atlántico lo alcanza entre los 3000- 3500m de profundidad (Feely et al., 2009). En los casos del Océano Pacífico e Índico, la insaturación de la aragonita se alcanza en profundidades que van de 100-1200m, dependiendo de la localización. El estado de saturación de la calcita para los océanos Pacífico e Índico es de 50-200m más profundo que el de la aragonita (Feely et al., 2009).

3.3.6 Predicciones de cambios en los horizontes de saturación de la calcita y aragonita

En los últimos 250 años, los horizontes de saturación de la aragonita se han desplazado hacia la superficie en todas las cuencas oceánicas, variando de 50 a 200 metros, dependiendo de la localización (Feely et al., 2009). Por ejemplo, en el Océano Pacífico del norte la migración hacia arriba del horizonte de saturación de la aragonita debido a la absorción de CO_2 de origen antropogénico es actualmente de 1– 2m por año (Fabry et al., 2008). Para las predicciones sobre los escenarios futuros Orr et al. (2005) desarrollo una serie de modelos basados en escenario de emisiones de CO_2 propuestos por el IPCC para cuantificar cambios futuros en la química del carbonato y encontró que en cualquiera de los escenarios hubieron grandes cambios en la $[\text{CO}_3^{2-}]$ tanto en la superficie como en la subsuperficie y que aunado a éste efecto geoquímico directo, la $[\text{CO}_3^{2-}]$ oceánico también es alterada por la variabilidad climática y por el cambio climático.

En esos escenarios, los cambios durante el siglo XXI en los estados de saturación de aragonita de los océanos serán los siguientes: el Océano Antártico actualmente tiene el horizonte de saturación para la aragonita a los 730m de profundidad pero este horizonte disminuirá su profundidad entre los 60-0m de profundidad. En el Atlántico del Norte las aguas de la superficie permanecerán saturadas con respecto a la aragonita pero, el horizonte de saturación disminuirá en profundidad dramáticamente yendo de los 2600m a los 610-115m de profundidad. En el Pacífico Subártico el horizonte de saturación de la aragonita se desplaza desde los 140m de profundidad hasta los 70-0m (Orr et al., 2005). Los cambios en el horizonte de saturación de la calcita serán menos pronunciados. Los intervalos de los cambios en la profundidad de los horizontes de saturación de la aragonita corresponden a los diferentes escenarios propuestos. Cuando se alcance el punto de insaturación en los océanos Pacífico del Norte y Antártico se tendrá la mitad de los niveles actuales de saturación de la aragonita y calcita y de $[\text{CO}_3^{2-}]$ (Fabry et al., 2008).

3.3.7 Sumidero oceánico

Todos los procesos que influyen en la absorción oceánica de CO_2 están controlados por el clima y, por tanto, los cambios naturales o los inducidos por las actividades humanas pueden alterar la capacidad de absorción de CO_2 del océano. El 20% del impacto de los cambios en las condiciones climáticas de la atmósfera pueden explicarse directamente por la respuesta del pCO_2 oceánico al calentamiento de la superficie oceánica. Los cambios en la circulación oceánica debido a cambios en los vientos causan el mayor efecto debido a que, los cambios en los vientos son particularmente importantes porque un mayor afloramiento causa una mayor salida de CO_2 (Le Quéré et al., 2010).

3.3.8 Transporte CO₂ entre los océanos

El intercambio de CO₂ antropogénico se determina a través de la medida de las presiones parciales de CO₂ en la atmósfera y la superficie oceánica, $\Delta p\text{CO}_2$, y el coeficiente de intercambio gaseoso entre aire-océano (Mikaloff Fletcher et al., 2006). Cuando la razón de mezcla de un gas atmosférico se incrementa exponencialmente, la recepción oceánica es inicialmente, proporcional a la tasa de crecimiento, dado que la tasa de crecimiento de un gas traza disuelto es proporcional a la cantidad total en la atmósfera.

La mayor absorción de CO₂ antropogénico ocurre en el Océano Antártico, particularmente en las regiones subpolares (44°S a 58°S) donde el flujo representa el 23% de la absorción total de CO₂ antropogénico (Mikaloff Fletcher et al., 2006). En los trópicos también hay una absorción considerable pero, en las aguas de latitudes medias la absorción es baja a pesar de que el almacenamiento de CO₂ antropogénico ocurre allí (Mikaloff Fletcher et al., 2006). Es probable que la alta absorción de CO₂ antropogénico en los trópicos y en las aguas de latitudes altas se deba a las altas tasas de transporte y mezcla de aguas subsuperficiales pobres en CO₂ antropogénico hacia la superficie. Además, se encontró que en las latitudes altas los vientos con alta velocidad tienen un efecto intensificador en la absorción de CO₂ antropogénico (Mikaloff Fletcher et al., 2006).

Globalmente, cerca del 50% del CO₂ antropogénico absorbido por el Océano Antártico es almacenado ahí mismo mientras que el resto es transportado hacia el ecuador, causando zonas de almacenamiento en las latitudes medias del hemisferio sur y un transporte transecuatorial hacia el norte. En el hemisferio norte el CO₂ antropogénico es transportado hacia los polos desde los trópicos y hacia el ecuador desde las latitudes medias, lo que causa su convergencia y almacenamiento en los subtropicos (Mikaloff Fletcher et al., 2006).

4. El pH y la espectrofotometría

El pH mide la acidez (H⁺) o basicidad (OH⁻) de una disolución acuosa. Cuando un ácido se disuelve en agua, el agua actúa como una base y acepta protones en forma de iones hidronio (H₃O⁺). Por otro lado, cuando una base se disuelve en agua, el agua actúa como un ácido que produce iones hidróxido para donar protones a la base. El pH se define como una escala negativa del logaritmo de base 10 y va de 0 a 14 (Myers, 2003; Prichard, 2003; Schuster et al., 2009). La medición del pH suele realizarse con temperaturas controladas entre 20°C y 25°C (Prichard, 2003) siendo 25°C la temperatura estándar debido a que a esa temperatura las concentraciones de los iones hidróxido e hidronio en agua son iguales entre sí, es decir, cada uno se encuentra en una concentración de 1.0×10^{-7} , por lo que tanto el pH como el pOH de una solución neutra a 25°C tienen un valor de 7 (Myers, 2003).

Conocer el pH en el agua de mar es sumamente importante ya que nos permite conocer los procesos que influyen en la posición de equilibrio del sistema de dióxido

de carbono oceánico, el intercambio de gases, mezcla, captación y regeneración biológica (Dickson A. G., 1993) así como el estado termodinámico de los sistemas ácido- base presentes en el agua de mar (Dickson A. G., 1993). Existen varios métodos de medición de pH, pero los más comúnmente utilizados en las investigaciones de agua de mar por su alta precisión son la potenciometría y la espectrofotometría (Dickson A. G., 1993).

4.1 Métodos de medición de pH

4.1.1 Potenciometría

La potenciometría es la técnica de medición de la diferencia de potencial que ocurre cuando existe actividad iónica entre dos soluciones diferentes separadas por una interfase. El potencial es el resultado del intercambio de energía libre que ocurre para que se llegue al equilibrio. Esta diferencia de potencial es medida por la sensibilidad a los iones de hidrógeno que tiene un electrodo dentro de un bulbo de vidrio y un electrodo de referencia separado (Schuster et al., 2009; Dickson A. G., 1993). La medición de pH con un potenciómetro ha sido utilizada comúnmente en las expediciones oceanográficas como un parámetro que debe de ser medido de rutina. El uso de esta técnica permite obtener una precisión máxima de ± 0.02 unidades de pH (Dickson A. G., 1993; Schuster et al., 2009), no es satisfactoria para la observación de pequeñas diferencias de pH oceánico (Robert- Baldo et al., 1985). Se recomienda que para la investigación del carbono oceánico se tenga una precisión de ± 0.002 unidades de pH (Schuster et al., 2009). La potenciometría necesita de extremo cuidado en el control de la temperatura de las muestras y cuidado en la preparación de las soluciones amortiguadoras o "buffer". Aunado a esto, pueden llegar a presentarse ciertos problemas relacionados con la susceptibilidad a la interferencia electromagnética, problemas con el electrodo de referencia y cambios en el tiempo en el electrodo de vidrio (Schuster et al., 2009; Dickson A. G., 1993; Robert- Baldo et al., 1985).

4.1.2 Espectrofotometría

La determinación espectrofotométrica del pH se realiza a partir de la medición de la absorbancia de ciertas longitudes de onda en muestras a las que se les ha añadido un indicador colorimétrico sensible a pH. El principio es que las formas ácidas y básicas del indicador de pH tienen diferentes colores y, por tanto, los espectros de absorción son sustancialmente diferentes, lo que permite que las concentraciones totales de los iones hidrógeno puedan ser calculadas a partir de las absorbancias medidas, la temperatura, la salinidad y la constante de disociación del indicador de pH utilizado (Schuster et al., 2009; Dickson et al., 2007). Esta técnica ha adquirido popularidad sobre la potenciometría porque presenta varias ventajas como que casi todos los problemas inherentes a la medición con potenciometría están ausentes, las

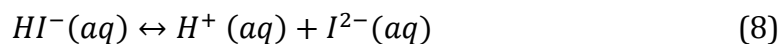
mediciones son estables en periodos de tiempo más largos que los necesarios para alcanzar un equilibrio y las tasas de equilibrio son dependientes de los procesos moleculares, lo que permite que las mediciones puedan realizarse de manera rápida minimizando así el tiempo de contacto de la muestra con superficies que puedan inducir un intercambio iónico (Dickson A. G., 1993; Robert- Baldo et al., 1985).

Otra de las características notables de este método es la posibilidad de almacenar los datos espectrofotométricos crudos y que estos puedan ser actualizados a medida que se refinan las mediciones de constantes de equilibrio y absorptividad molar de los indicadores siempre y cuando, las condiciones de medición también hayan sido registradas (salinidad y temperatura) (Yao et al., 2007). Además, las mediciones son autocalibrables ya que las propiedades de los indicadores son constantes físico- químicas que pueden ser actualizadas tan pronto se tengan disponibles caracterizaciones más refinadas (Clayton & Byrne, 1993; Yao et al., 2007).

Es posible obtener precisiones de ± 0.001 unidades de pH (Byrne & Breland, 1989). Al alcanzar tal grado de precisión y sensibilidad, las mediciones de pH de agua de mar pueden llegar a ser un parámetro importante para evaluar la consistencia interna de las mediciones de carbono inorgánico disuelto, la fugacidad del dióxido de carbono en equilibrio con una muestra de agua, $f(\text{CO}_2)$ y la alcalinidad total (Dickson A. G., 1993). La espectrofotometría también requiere de cuidados en el control de la temperatura de las disoluciones y de la celda del espectrofotómetro, la preparación de disoluciones indicadoras con una fuerza iónica cercana a la del agua de mar, que la mezcla de la muestra y la solución indicadora sea homogénea, que el indicador utilizado esté caracterizado adecuadamente y que sea almacenado apropiadamente para evitar contacto con el CO_2 atmosférico (Schuster et al., 2009; Clayton & Byrne, 1993).

4.2 La teoría de la espectrofotometría

Según Dickson et al. (2007), la reacción de interés para el pH de agua de mar es la correspondiente a la segunda disociación:



donde I representa el indicador en su forma básica, presente en una cantidad baja en la muestra de agua de mar. El pH en la muestra puede ser determinado mediante:

$$pH = pK(HI^-) + \log_{10} \frac{[I^{2-}]}{[HI^-]} \quad (9)$$

Esta fórmula usa como principio el hecho de que las diferentes formas del indicador tienen diferentes espectros de absorción por tanto, la información del espectro puede ser utilizada para estimar la razón de las concentraciones $[I^{2-}/HI^-]$.

Dada una longitud de onda individual, λ , la absorbancia medida en una celda con una distancia de camino de la luz, l , es dada por la ley de Beer-Lambert:

$$\frac{A_\lambda}{l} = \varepsilon_\lambda(HI^-)[HI^-] + \varepsilon_\lambda(I^{2-})[I^{2-}] + B_\lambda + e \quad (10)$$

donde B_λ corresponde a la absorbancia de fondo de la muestra y e es un error debido al ruido instrumental. Considerando que los valores de los coeficientes de extinción $\varepsilon_\lambda(HI^-)$ y $\varepsilon_\lambda(I^{2-})$ hayan sido medidos como una función de la longitud de onda, entonces las mediciones de absorbancia de dos o más longitudes de onda pueden ser utilizadas para estimar la relación $[I^{2-}]/[HI^-]$.

4.2.1 Cálculo de pH

Si se tiene el caso en el que solo se utilicen dos longitudes de onda, que la absorbancia de fondo pueda ser eliminada efectivamente por un procedimiento sustractivo y se asuma que no existe ruido instrumental, la ecuación (10) puede ser reacomodada de la siguiente manera:

$$\frac{[I^{2-}]}{[HI^-]} = \frac{A_1/A_2 - \varepsilon_1(HI^-)/\varepsilon_2(HI^-)}{\varepsilon_1(I^{2-})/\varepsilon_2(HI^-) - (A_1/A_2) \varepsilon_2(I^{2-})/\varepsilon_2(HI^-)} \quad (11)$$

donde los números 1 y 2 se refieren a las longitudes de onda elegidas. Para tener una sensibilidad óptima, las longitudes de onda utilizadas corresponden a las respectivas de la absorbancia máxima de la base (I^{2-}) y del ácido (HI^-). El término ε es el coeficiente de extinción de las especies especificadas a longitudes de onda 1 y 2, respectivamente.

Los valores de A_1/A_2 se obtienen de la siguiente ecuación:

$$A_1/A_2 = \frac{(578nm^{**} - 578nm^*) - (730nm^{**} - 730nm^*)}{(434nm^{**} - 434nm^*) - (730nm^{**} - 730nm^*)} \quad (12)$$

** valores de absorbancia obtenidos después de haber sido añadido el m-Cresol y * valores de absorbancia de los blancos para la longitud de onda indicada

Los términos de coeficientes de extinción ε corresponden a los valores medidos para las especies especificadas en las longitudes de onda 1 y 2 (Tabla 1):

Tabla 1 Rangos de coeficientes de extinción para el m-Cresol púrpura (Dickson et al., 2007)

$\varepsilon_2(HI^-)/\varepsilon_1(HI^-)$	0.00691
$\varepsilon_2(I^{2-})/(\varepsilon_1(HI^-))$	2.2220
$\varepsilon_1(I^{2-})/\varepsilon_1(HI^-)$	0.1331
$\lambda_1 = 578nm; \lambda_2 = 434 nm.$	

Con manipulación algebraica y dividiendo la ecuación (12) por $I_{\epsilon_{HI}}$ obtenemos (Dickson et al., 2007):

$$pH = pK + \log\left(\frac{A_1/A_2 - 0.00691}{2.2220 - (A_1/A_2 * 0.1331)}\right) \quad (13)$$

Las longitudes de onda óptimas para ser utilizadas son las que corresponden a la absorbancia máxima de las formas ácida y básica, 434 y 578nm, respectivamente (Dickson A. G., 1993). pK es la constante de disociación ácida para la especie HI^- (expresada en la escala de concentración total de iones de hidrógeno en mol kg⁻¹) y depende de los valores de salinidad y temperatura (Dickson et al., 2007).

$$pK = \frac{1245.69}{(T/K)} + 3.8275 + 0.00211(35 - S) \quad (14)$$

donde $293 \leq T/K \leq 303$ y $30 \leq S \leq 37$.

Si se sustituye el valor de pK en la ecuación 13 y se utilizan los coeficientes de extinción propuestos, entonces obtenemos que el pH está calculado a partir de la ecuación (Clayton & Byrne, 1993; Dickson et al., 2007):

$$pH = \frac{1245.69}{(T/K)} + 3.8275 + 2.11 \times 10^{-3}(35 - S) + \log\left(\frac{A_1/A_2 - 0.0069}{2.222 - (A_1/A_2 * 0.1331)}\right) \quad (15)$$

4.3 Los indicadores

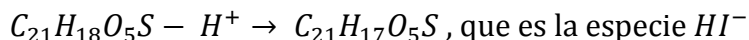
El agua de mar es el medio ideal para el uso de colorantes indicadores espectrofotométricos sensibles a pH, debido a que su composición es casi invariable, la concentración de sales disueltas varía en un rango muy pequeño ($34 \leq S\%_o \leq 36$ para el 98% del volumen de los océanos) y en gran parte del océano, la salinidad y la temperatura son sustancialmente constantes ($0 \leq t \leq 6$ °C y $34 \leq S\%_o \leq 35$ para el 79% del volumen oceánico). La composición constante del agua de mar (constancia de las relaciones molares de sus componentes mayores) y las bajas concentraciones de elementos reactivos producen pequeños cambios inducidos por el medio a las características físico- químicas de los indicadores (Robert- Baldo et al., 1985). Además, las formas ácidas y básicas tienen diferentes espectros de absorción en el visible lo que resulta en un cambio de color notorio a simple vista a medida que el pH de la solución cambia, lo que permite que la concentración de las formas ácidas y

básicas de la disolución puedan ser medidos espectrofotométricamente (Carter et al., 2013).

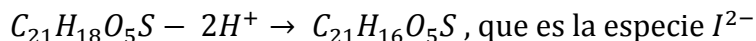
La selección del indicador depende principalmente del pH que se espera obtener en la muestra. Como guía se considera que el logaritmo de la constante de formación del indicador de sulfoneftaleína ($\log K_n$) debe de ser comparable con el pH de la muestra ($\log K_n(\text{indicador}) - 1 < \text{pH}(\text{muestra}) \leq \log K_n(\text{indicador})$) (Clayton & Byrne, 1993). Byrne & Breland (1989) mostraron que estos indicadores proveen una base molecular para evaluar el pH de una disolución de una manera muy similar a como lo hacen para las disoluciones buffer estándar. Los indicadores que suelen ser más utilizados son thymol azul, m-Cresol púrpura (mCP) y Cresol rojo (Dickson A. G., 1993). Clayton & Byrne (1993) mencionan que el indicador de sulfoneftaleína más indicado para realizar perfiles de pH de la superficie a la profundidad en océano abierto es el m-Cresol púrpura (mCP; $\log K_1 \approx 8.0$). Todos los indicadores de sulfoneftaleína existen en tres formas H_2I , HI^- y I^{2-} ; cada uno tiene características de absorción únicas y para el ojo humano se ven de diferentes colores siendo, rosa, amarillo y morado, respectivamente.

4.3.1 Meta Cresol púrpura

El m-Cresol púrpura es un indicador sulfoneftaleínico comúnmente utilizado para realizar mediciones de pH y es el más apropiado para mediciones realizadas en muestras originarias de perfiles de agua oceánica de la superficie al fondo (Yao et al., 2007). Su fórmula empírica es $C_{21}H_{18}O_5S$ y su peso molecular es de 382.43. Puede ser utilizado en disoluciones cuyos valores de pH van de 1.2- 2.8, con coloración roja a amarilla, y de 7.4 a 9.0, con coloración amarilla a violeta (m-Cresol Purple). En la Figura 2 el indicador de m-Cresol púrpura se encuentra en la especie protonada H_2I : $C_{21}H_{18}O_5S$, pero cuando interactúa con agua de mar, el rango de absorción está dominado por dos especies, la I^{2-} : $C_{21}H_{16}O_5S$ que es la especie desprotonada (medio básico) y tiene coloración púrpura con absorbancia máxima en la longitud de onda de 578nm, y la especie HI^- : $C_{21}H_{17}O_5S$ que está parcialmente desprotonada (medio ácido) y presenta una coloración amarilla con absorbancia máxima en los 434nm (Carter et al., 2013). En un medio ácido:



y en un medio básico:



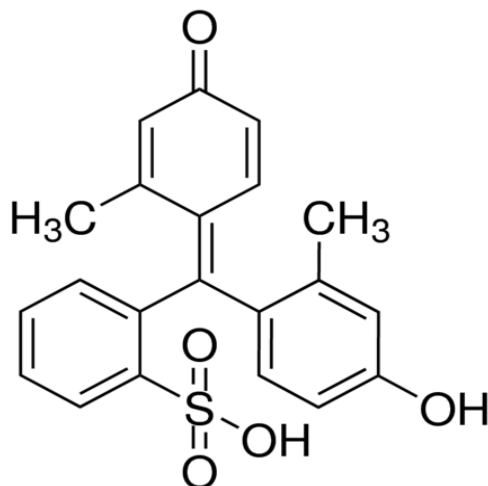


Figura 2 Estructura de meta Cresol Púrpura (m-Cresol Purple)

4.4 Correcciones de las lecturas

4.4.1 Corrección de las absorbancias medidas por el blanco

Para las correcciones de las absorbancias medidas, las longitudes de onda de absorbancia utilizadas deben ser aquellas en las que la absorción de las especies básica I^{2-} y ácida HI^- del indicador sea máxima (578 nm y 434 nm, respectivamente) y la longitud de onda en la que el indicador no absorba en absoluto (para m-cresol púrpura 730 nm) (Dickson et al., 2007). Para hacer la corrección, a las absorbancias se les sustrae la absorbancia medida con el blanco (el medio sin indicador). Una vez realizada esta corrección entonces se puede calcular la razón de absorbancias A_1/A_2 que describe el grado de protonación del indicador.

La absorbancia en la longitud de onda no absorbente (730 nm) nos permite saber si existe algún error que se deba al mal posicionamiento de la celda. La diferencia entre la absorbancia del blanco y de la muestra con indicador a 730 nm no debe ser mayor a ± 0.001 . En caso de que lo sea, se deben limpiar las ventanas ópticas de la celda antes de continuar las mediciones ya que es muy probable que se deban a interferencias físicas en el paso de luz (Byrne & Breland, 1989). Con esta precaución se asegura que la magnitud de cualquier cambio en la línea base sea idéntica en todo el espectro visible. Las desviaciones en 730nm deben ser sustraídas cuando sean positivas y añadidas cuando sean negativas (Byrne & Breland, 1989).

4.4.2 Adición de indicador m-Cresol púrpura

Como el indicador es por sí mismo un sistema ácido-base, puede cambiar el pH del agua en el que se añade. El pH de interés es aquél que tiene la muestra antes de haberse añadido el indicador, lo que es importante estimar y corregir la perturbación que el indicador causa en el pH de la muestra (Carter et al., 2013). La inyección del

indicador en la muestra de agua de mar causa una pequeña perturbación en el pH (≤ 0.005 unidades de pH) que está en función de la diferencia de acidez de la muestra y la del indicador. Conviene hacer el ajuste de pH de indicador en 7.9~ 8 unidades de pH (Clayton & Byrne, 1993; Dickson et al., 2007; Carter et al., 2013).

4.5 Precauciones

4.5.1 Impurezas en el indicador de m-Cresol púrpura.

Como se menciona en la sección de Espectrofotometría, para poder hacer posteriores ajustes a las mediciones obtenidas con indicadores colorimétricos es necesario que se tengan registrados los datos espectrofotométricos crudos y las condiciones de medición (volumen de indicador añadido, salinidad de la muestra, temperatura a la que se realizaron las mediciones, algoritmos usados para calcular R y pH, documentos para el control de calidad de los datos, y, sobre el indicador: la descripción del indicador, su valor de R_i , y la perturbación de pH inducida por su adición a la muestra.) (Clayton & Byrne, 1993; Yao et al., 2007). Sin embargo, existe una limitante y es que si no se tienen caracterizadas las impurezas del indicador que absorben en las mismas longitudes de onda que las especies HI^- y I^{2-} no es posible realizar la actualización (Yao et al., 2007).

Para el meta-Cresol púrpura, Yao et al. (2007) realizó un experimento en el que comparó 7 marcas diferentes de indicador y encontró que hay diferentes tipos y cantidades de impurezas entre estos. Las impurezas que encontró absorben entre los 380nm y los 434 nm que también corresponden a la longitud de onda en la que absorbe la especie HI^- del m-Cresol. Los indicadores que tienen impurezas que absorben en los 434nm pero no en los 578nm dan valores de R menores ($R = A_1/A_2$) y por lo tanto disminuye el valor de pH reportado para la muestra. Las impurezas en el indicador pueden llegar a presentar diferencias en el pH medido de $\sim 0.01-0.02$ unidades de pH (Yao et al., 2007; Liu et al., 2011; Carter et al., 2013). Liu et al. (2011) propone un método para purificar el indicador de manera eficiente e independiente de la marca del indicador.

Algunas de las recomendaciones que menciona Yao et al. (2007) es que se registren las marcas y números de lote de los indicadores y se reserve una muestra del indicador para que se puedan hacer comparaciones posteriores y las correcciones puedan hacerse cuando se tengan los indicadores purificados disponibles. Si se utiliza un indicador colorimétrico para medir el pH de las muestras es recomendable realizar la corrección relacionada con la adición del indicador ya que la corrección correspondiente a las impurezas puede realizarse una vez que se tenga puro el indicador.

4.5.2 Intercambio gaseoso

El pH del agua oceánica es muy sensible a la pérdida o ganancia de CO_2 del agua por medio de intercambio gaseoso con el aire, por lo que se deben tomar medidas que

limiten la exposición de la muestra con la atmósfera durante su colecta, almacenamiento y medición (Carter et al., 2013).

4.5.3 Adición de HgCl₂

El cloruro mercúrico se utiliza como biocida para conservar la muestra y evitar alteraciones por procesos biológicos que puedan ocurrir en el tiempo de almacenamiento en caso de que las muestras no sean analizadas inmediatamente (Dickson et al., 2007; Carter et al., 2013). La adición de HgCl₂ a la muestra causa una disminución en el pH de la muestra y la afecta en 0.00003 unidades de pH en promedio (Carter et al., 2013).

4.5.4 Degradación por luz ultravioleta

El indicador meta Cresol púrpura se degrada si se expone a luz ultravioleta, y existe posibilidad de que la luz UV pueda afectar el pH de la muestra debido a la fotodegradación de la materia orgánica. Se observa que el pH tiende a disminuir en 0.00025 unidades cuando la lámpara de deuterio es utilizada en valores de pH básicos lo que sugiere que la fotólisis afecta a la especie I²⁻ pero no a la especie HI⁻ (Carter et al., 2013).

4.6 Calibración con TRIS

El buffer de TRIS (2-amino-2-hydroxymethyl-1,3 propanediol) en agua marina artificial se utiliza actualmente como uno de los principales estándares para las mediciones de escalas de pH oceánico (DelValls & Dickson , 1998) y es usado para conocer el pK* de los indicadores colorimétricos y calibrar las mediciones realizadas con los mismos con una precisión de ±0.001 (Liu et al., 2011; Millero et al., 1993; Nemzer & Dickson, 2005). Además, éste buffer es capaz de mantenerse estable por periodos de hasta un año después de haber sido envasado por lo que puede ser utilizado para monitorear el desempeño del espectrofotómetro durante un crucero oceanográfico (Nemzer & Dickson, 2005; Millero et al., 1993)

4.7 Uso del espectrofotómetro

El espectrofotómetro Agilent 5384 tiene un arreglo de diodos más simple que el de los espectrofotómetros de doble haz de luz utilizados en otros experimentos (Carter et al., 2013). Esta diferencia puede causar cambios en la intensidad de la fuente de luz en el tiempo que transcurre desde que se mide la absorbancia del blanco y el de la muestra con indicador. Es por esta razón muy importante realizar las correcciones relacionadas con la longitud de onda de 730nm en las que no absorbe el indicador.

En el presente trabajo, podemos tomar en cuenta las recomendaciones realizadas por Carter et al. (2013) ya que él también utiliza un espectrofotómetro Agilent 5384 y también trabaja con indicador de *m*-Cresol Púrpura.

- Se asume que cualquier cambio de la línea de absorbancia en el tiempo, es aproximadamente idéntica en todas las longitudes de onda de interés.
- En vez de utilizar solamente la longitud de onda de 730nm, se utiliza el promedio de resultados obtenidos de la región entre 725 y 735 nm. Esto permite quitar del promedio fluctuaciones aleatorias de los diodos entre los 725 y 735nm mientras que se ajustan los cambios correlacionados en este rango de longitudes de onda.

5. Objetivos

5.1 Objetivo general

Establecer la metodología de medición de pH en agua de mar mediante espectrofotometría de luz visible con la exactitud y precisión necesaria para que los resultados puedan ser reproducidos y muestren variaciones de pH típicos de lagunas costeras.

5.2 Objetivos particulares

- Conocer y describir el uso de un espectrofotómetro Agilent 5384 UV/VIS.
- Establecer las cantidades de indicador (púrpura de meta-Cresol) y de conservador de las muestras (HgCl_2) para un óptimo proceso de la medida de pH de muestras de agua marina.
- Conocer la magnitud de las correcciones necesarias por adición del indicador y de HgCl_2 , para garantizar una medida precisa de pH.
- Determinar la precisión y reproducibilidad de las medidas de pH en agua de muestras costeras.
- Estandarizar el proceso de mediciones para obtener valores de pH más precisos y garantizar el mejor desempeño del espectrofotómetro Agilent 5384 UV/Vis.

6. Hipótesis

El uso de la espectrofotometría UV/VIS permite obtener una precisión y exactitud suficientemente alta en la medida de pH de agua de mar siempre y cuando se sigan las medidas analíticas necesarias de preparación de muestras, cuidado y manejo del equipo.

7. Material y métodos

Todas las medidas de absorbancia realizadas en el laboratorio se obtuvieron usando:

- Computadora personal Hewlett Packard
- Espectrofotómetro de la marca Agilent modelo 8453A UV-Vis: este sistema utiliza una configuración de fotodiodos que permite la medición simultánea del espectro de luz visible y ultravioleta.
- La gestión de datos y el análisis de los espectros se realizó con el software Agilent ChemStation (Agilent technologies, 2011). El compartimiento de las celdas se termostató a $25.0 \pm 0.1^\circ\text{C}$ por medio de un peltier Agilent modelo 89090A.
- Celdas de 3 cm de vidrio Pyrex con 10mm de paso de luz manufacturadas por Perkin-Elmer.
- Indicador: púrpura de metacresol en polvo de la marca Reasol lote: 1345. Se preparó con una concentración de 2mM y pH = 7.9 para el primer lote, y con una concentración de 2mM y pH = 8.086 para el segundo lote.
- La cantidad de indicador se añadió con un gotero previamente calibrado (1 gota = 0.5ml).
- Cloruro mercuríco (HgCl_2) en solución saturada (7.4g/100ml) como biocida y conservador.

7.1 Agua marina

7.1.1 Agua marina artificial

- Agua marina artificial 1 (AMA1): preparada con una mezcla de sales de Sigma sea salts de 1 kg, catálogo S-0131, lote 36H098625 y salinidad de 35ppm.
- Agua marina artificial 2 (AMA2): preparada mezclando las siguientes sales (Tabla 2), de la marca J.T. Baker: cloruro de magnesio (lote: 2444-01, 500g), cloruro de calcio (lote: 1332-01, 500g), cloruro de potasio (3040-01, 500g), sulfato de sodio (lote: 3891-01, 500g), cloruro de sodio (lote: 3624-01, 500g), bicarbonato de sodio (lote: 517337, 500g), de Reasol: fluoruro de sodio técnico (SN, 500g) y Sigma: ácido bórico (lote: 119H0002) y salinidad de 35ppm fórmula tomada de (Kester et al., 1967).
- Agua marina artificial 3 (AMA3) (DeValls & Dickson (1998)), preparada mezclando las siguientes sales (Tabla 3): J.T. Baker: cloruro de magnesio (lote: 2444-01, 500g), cloruro de calcio (lote: 1332-01, 500g), cloruro de potasio (3040-01, 500g), sulfato de sodio (lote: 3891-01, 500g), cloruro de sodio (lote: 3624-01, 500g). Las proporciones para 1 litro son las mencionadas en la Tabla 3. Esta agua se utilizó para la preparación del TRIS. La salinidad de las muestras de pH 7.5 y 7.7 es de 36.9716 ppm, para las muestras de pH 8 y 8.3 es de 36.7499 ppm, y para la muestra de pH 8.5 es de 35.8860 ppm.

- Agua marina artificial 3.1 (AMA3.1): como el AMA3 pero con una salinidad final de 35.2623.
- Agua marina artificial 3.2 (AMA3.2): como el AMA3 pero con una salinidad final de 34.429.

Tabla 2 Composición de 1 litro de agua marina artificial (AMA2); (Kester et al., 1967).

Componente	Gramos por litro
NaCl	23.926
MgCl ₂ •6H ₂ O	10.8314
CaCl ₂	1.5188
Na ₂ SO ₄	4.008
KCl	0.775
NaHCO ₃	0.196
H ₃ BO ₃	0.026
NaF	0.003

Tabla 3 Composición de 1 litro de agua marina artificial (AMA3) fórmula propuesta por DeValls & Dickson (1998)

Componente	Gramos por litro
NaCl	24.9968
Na ₂ SO ₄	4.1563
KCL	0.7877
MgCl ₂ •6H ₂ O	10.997
CaCl ₂	1.1707

En cualquiera de las fórmulas anteriores, las sales fueron desecadas por un mínimo de 12 horas, posteriormente pesadas en seco y disueltas en agua desionizada (desionizador Barnstead modelo 04751) a 18.3 MΩ-cm. La temperatura fue controlada con una parrilla termostato y fueron mezcladas con una mosca imantada.

7.1.2 Agua marina natural

- Agua marina natural 1 (AMN1): agua marina natural de las costas de Nayarit (21° 42' latitud norte y 105° 33' longitud oeste).
- Agua marina natural 2 (AMN2): agua marina natural del Estero Urías (23° 09' y 23° 12' de latitud norte, 106° 18' y 106° 25' de longitud oeste), al sur de Mazatlán y al norte de la desembocadura del río Presidio, Sinaloa.

7.2 TRIS

Para la preparación del TRIS se utilizaron las siguientes sales: SIGMA Trizma hydrochloride (lote: SLBF8781V, 250g) y SIGMA Trizma base (lote: SLBG1495V, 1kg). Se utilizaron como referencia las proporciones especificadas por Trizma Buffers. Las sales se desecaron por un mínimo de 12 horas, se pesaron y se disolvieron en 500ml de AMA3. La temperatura fue controlada con una parrilla termostato y fueron mezcladas con una mosca imantada. En la Tabla 4 se muestran las proporciones necesarias para tener una concentración 0.04M, la utilizada en nuestros experimentos.

Tabla 4 Cantidad de sales de TRIS necesarias para obtener medio litro de AMA con pH 7.5, 7.7, 8, 8.3 y 8.5

pH	Trizma hydrochloride (g)	Trizma base (g)
7.5	2.540	0.472
7.7	2.288	0.664
8	1.176	1.060
8.3	1.228	1.480
8.5	0.884	1.744

7.3 Protocolo de laboratorio

7.3.1 Inicio

En primer lugar encender la computadora y esperar a que esté totalmente iniciada. Cuando se enciende el espectrofotómetro el foco LED frontal está en amarillo. Se debe aguardar a que cambie de color a verde y que las partes internas cesen de moverse para que se pueda encender el termostato. En este momento, abrir el programa Agilent Chemstation en modo on-line. Es importante que se sigan estos pasos metódicamente para evitar problemas de comunicación. En caso de problemas de comunicación se recomienda apagar todo y reiniciar el proceso de encendido.

7.3.2 Espectrofotómetro

El espectrofotómetro, debe ser prendido 30 minutos antes de realizar las mediciones, para que las lámparas se calienten y estabilicen. Una vez transcurrido este tiempo ya se pueden hacer las lecturas. Se sabe que el espectrofotómetro está listo para ser utilizado por que el foco LED está en verde.

7.3.3 Las celdas y muestras

Las celdas de vidrio que se usan para realizar las lecturas de absorbancia se preparan lavándolas previamente con un poco de acetona y limpiando cuidadosamente las caras exteriores con papel seda humedecido también con acetona. Posteriormente, se enjuagan con agua desionizada, se escurren y secan, y se pone la muestra que se quiere utilizar. Se debe esperar a que la muestra estabilice su temperatura en $25.0 \pm 0.1^\circ\text{C}$ para que después se pueda fijar el blanco del espectrofotómetro y hacer las lecturas del blanco (que son utilizadas para hacer los cálculos de pH). Entonces, se añade el indicador de m-Cresol a la muestra, se homogeneiza la muestra y se le coloca el termómetro. Cuando se añade el indicador, la temperatura varía, por lo que se debe esperar a que se estabilice en $25.0 \pm 0.1^\circ\text{C}$. Una vez que la muestra alcanza la temperatura deseada se pueden hacer las lecturas. Para cada lectura se debe de esperar a que el foco LED vuelva a estar en verde y terminen de moverse las partes internas del espectrofotómetro. En promedio cada lectura tarda 6 segundos. Cuando

se quiere cambiar de muestra, se desecha la muestra leída y la celda se enjuaga dos veces con el agua de la siguiente muestra que se va a medir. Es importante que se revisen las paredes externas de la celda para verificar que no hay rastros de grasa de los dedos o manchas que puedan impedir el adecuado paso de la luz.

7.3.4 El programa

Desde el programa se pueden fijar los valores de temperatura, la acción del agitador, el encendido de las lámparas y las longitudes de onda que se van a utilizar. La totalidad del espectro es registrado y guardado.

Las longitudes de onda que se usaron para la primera fase experimental son las propuestas por Dickson et al. (2007) que corresponden a las longitudes de onda máximas de absorción del m-Cresol para la especie básica (I^{2-}) en 578nm, ácida (HI^{-}) en 434nm y en la que no absorbe ninguna de 730 nm.

Todas las opciones pueden ser modificadas en cualquier momento de las lecturas con excepción de las lámparas, en cuyo caso se debe de tomar una nueva lectura de blanco cada vez que se prenda o apague alguna de ellas. Es recomendable que las lecturas se nombren en cuanto sean realizadas ya que el programa no las nombra. La información del espectro y parámetros pueden exportarse y guardarse cada vez que se termine de hacer un experimento. Esa información puede ser consultada en cualquier momento con el modo out-line del programa sin necesidad de prender el espectrofotómetro.

7.4 Protocolo de campo

Para la recolección de las muestras de agua marina natural (AMN1 y AMN2)

7.4.1 AMN1 10/10/2014

La recolección de las muestras se hizo con una botella tipo Niskin a una profundidad de 15.5m.

7.4.2 AMN2 07/07/2015

Se tomaron 10 muestras de 60mL de agua para la medida de pH a lo largo de un transecto desde la boya de recalada (01) hasta el fondo del Estero (10) (Figura 3). Se recogió agua superficial (50 cm) con una botella Niskin en posición horizontal desde un lado de la lancha a baja velocidad.

Una vez recogida el agua en la botella Niskin, se tomó una botella Pyrex de 60 ml se introdujo el tubo de plástico de muestreo hasta el fondo de la botella y se llenó la botella con un overflow de al menos el 100%. Con una pipeta de plástico, se ajustó el volumen por debajo el nivel del tapón. Se añadieron 2 gotas de $HgCl_2$ concentrado.

Aparte, se secó el tapón de la botella de vidrio y se colocaron tres tiras finas de grasa de silicona, se tapó la botella herméticamente, se ajustó con ligas elásticas y se guardó la muestra en una caja. En el laboratorio, la caja se guardó en refrigerador.



Figura 3 Lugares de muestreo del Estero de Uriás, Mazatlán, Sinaloa

7.5 Cálculos

7.5.1 Cálculo de la salinidad

La salinidad de las muestras fue medida por medio de la técnica de titulación con nitrato de plata ($AgNO_3$) utilizando un dispensador 865 Dosimat plus 20 ml de la marca Metrohm. Para hacer la titulación se debe tener un volumen conocido de una muestra (10ml) de agua de la cuál se quiere conocer la salinidad. Se añaden 10 gotas de cromato de potasio (K_2CrO_4) y posteriormente se añade $AgNO_3$ gota a gota con el dispensador hasta que comience a precipitar y la coloración de la muestra cambie de amarillo lechoso a rojo ladrillo. Éste procedimiento se hace por triplicado y se anotan los volúmenes de $AgNO_3$ requeridos en cada caso. Se obtiene el promedio de los volúmenes y se calcula la salinidad con la siguiente ecuación:

$$S\%_0 = \left(\frac{ml(AgNO_3) * N(AgNO_3) * 35.453}{Vol\ de\ muestra} \right) * 1.80655 \quad (16)$$

donde la normalidad de $AgNO_3$ es 0.17968 y el factor gravimétrico de $AgNO_3$ es 1.80655.

Para el caso del AMN2, la salinidad se calculó a partir de la temperatura y conductividad registradas en campo, la calculadora web de Chemiasoft (Chemiasoft).

7.5.2 Cálculo de pH

Para el cálculo de pH es necesario contar con los valores de absorbancia para los picos de 434nm, 578nm y 730nm del blanco de la muestra y de las muestras con indicador de m-Cresol con el espectrofotómetro. Además, se necesita saber el volumen de indicador que está siendo añadido, la temperatura de la muestra cuando se hicieron las lecturas y la salinidad de la muestra. El cálculo de pH se hace por medio de la fórmula 15.

7.6 Correcciones y calibración

7.6.1 Corrección por adición de m-Cresol púrpura

La adición del indicador de m-Cresol puede llegar a modificar el pH en ~0.01-0.02 unidades de pH de la muestra debido a que es otro sistema ácido-base que está siendo agregado (Yao et al., 2007; Liu et al., 2011; Carter et al., 2013). Para contrarrestar esta contribución se debe hacer la siguiente corrección:

$$pH_{corr} = pH - \Delta m_{cresol} \quad (17)$$

7.6.2 Calibración con TRIS

La calibración con TRIS se hace con el fin de validar el método, en su defecto, realizar una calibración. Se hace una calibración puntual a partir de la diferencia entre el valor de pH fijado con TRIS y el valor de pH que se obtuvo de la lectura de esa muestra. Esa diferencia es la que posteriormente se suma o se resta (según sea el caso) a los valores de pH obtenidos de las lecturas de pH de muestras de agua de mar.

$$pH_{TRIS} - pH_{medido} = \text{valor de la calibración} \quad (18)$$

7.7 Experimentación

En primer lugar se optimizaron las condiciones de uso del espectrofotómetro para la medida de pH en muestras de agua de mar artificial: comparación del uso de la lámpara de tungsteno contra el uso de las lámparas de tungsteno y deuterio; estimación de las diferencias entre el uso de la celda fija y la celda de flujo; evaluación de la eficiencia del termostato (AMN1); las diferencias entre diferentes volúmenes de indicador; determinación de la degradación del indicador en el tiempo. Posteriormente se realizaron los experimentos que nos permitieron determinar las correcciones necesarias, incluyendo una calibración final: contribución del m-Cresol a los valores de pH obtenidos, contribución por la adición de $HgCl_2$ y calibración con TRIS. Por último, se probó la metodología y se realizaron mediciones de pH en agua de

mar natural proveniente del Estero de Urías. Los materiales y el procedimiento de cada uno de los experimentos se encuentran en la parte del Anexo Metodologías experimentales.

8. Resultados

8.1 Comparación de celdas

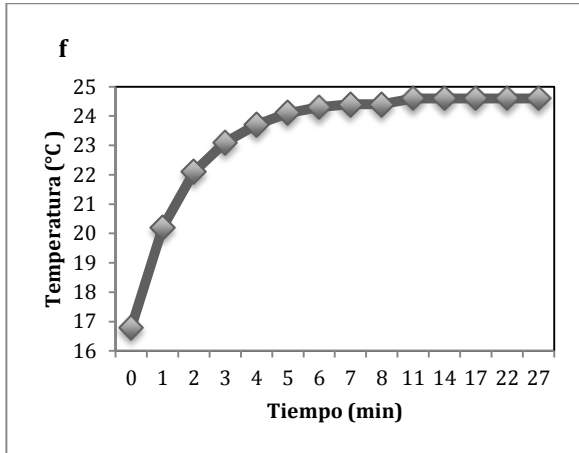
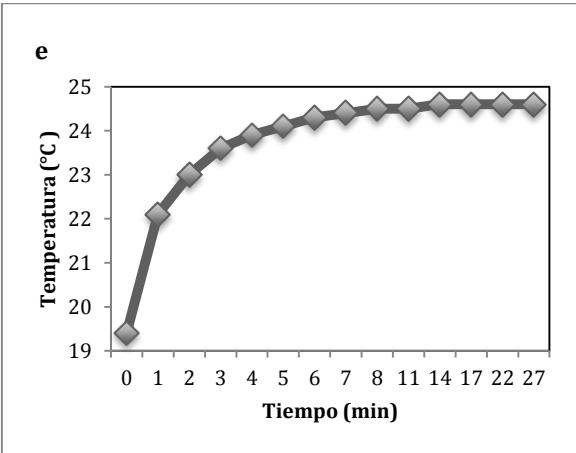
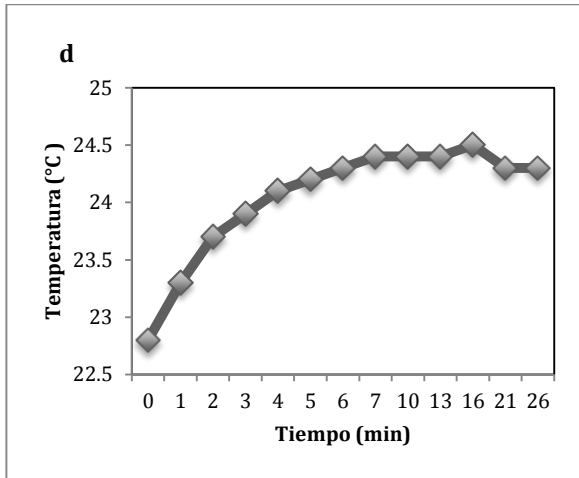
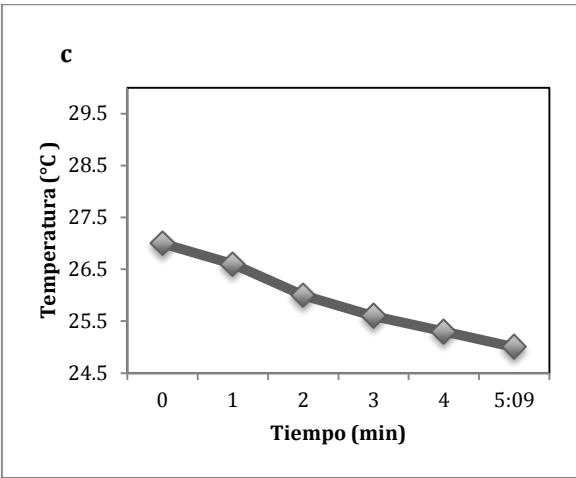
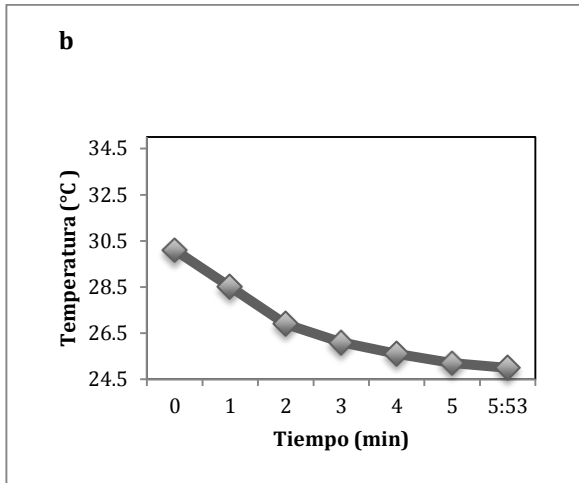
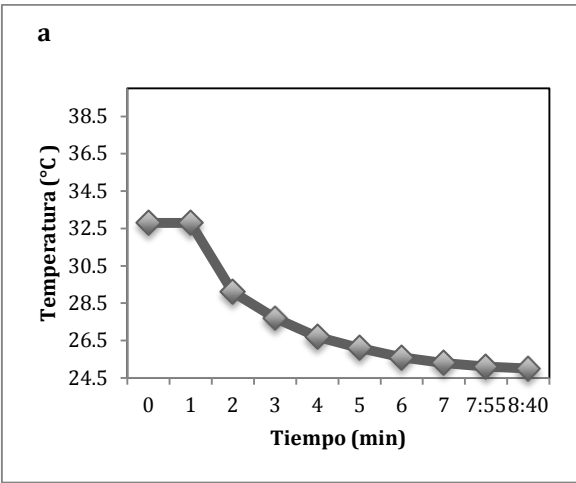
Se determinó qué tipo de celda es la más adecuada para la medida de pH por espectrofotometría y se compararon para saber si existían diferencias de absorbancia entre las mediciones obtenidas con una celda de flujo y una celda fija. La metodología se explica en el Anexo 1 Método 1. Las medias y las desviaciones estándar de las absorbancias obtenidas con cada celda para las longitudes de onda de 434 y 578nm se presentan en el Anexo 2 Tabla 1. El análisis de varianza de una vía se realizó con $\alpha=5\%$ y reveló diferencias significativas entre ambos métodos para ambas longitudes de onda (434nm: $F(1,13)= 647.6$, y 578nm: $F(1,13)= 7,061$). En todos los casos $p<0.05$ por lo que concluimos que sí existen diferencias significativas entre las celdas. Las diferencias entre las absorbancias leídas pueden deberse a que la cantidad de indicador añadido a la muestra utilizada en la celda de flujo continuo no fue proporcional a la cantidad añadida a la muestra de la celda fija o puede que se deba a que los 80 microlitros de muestra en la celda de flujo continuo no tienen la misma absorbancia que la muestra en celda fija.

Se decidió continuar utilizando la celda fija, pues se consideró que es más fácil trabajar con ella y es posible controlar de manera directa la temperatura de la muestra. Sin embargo, utilizando esta celda se debe esperar a que la muestra llegue a la temperatura deseada, lo que puede causar intercambio gaseoso con la atmósfera (Dickson et al., 2007).

8.2 Eficiencia del termostato

Con este experimento se quiso conocer el tiempo necesario para obtener el equilibrio térmico de la muestra a diferentes temperaturas ambiente con el termostato del espectrofotómetro (25°C). La descripción metodológica se encuentra en el Anexo 1 Método 2.

En la Figura 4 se muestra la evolución temporal de la temperatura en diferentes condiciones. En la Figura 4 a, b y c, se observa que la pérdida de temperatura de la celda fue rápida y en todos los casos se alcanzó la temperatura deseada de $25.0\pm 0.1^\circ\text{C}$ después de 5, 6 y 7 minutos, respectivamente. Por otro lado, en las muestras correspondientes a la Figura 4d, e, f y g el aumento de la temperatura fue rápido hasta llegar a los 23 ~ 24 grados Celsius y, a partir de ese momento, el aumento de temperatura se hizo muy lento (asintótico) y nunca se alcanzó la temperatura deseada. Es evidente que es muy ineficiente esperar tanto tiempo para que las muestras lleguen al equilibrio. Por esto, es recomendable tener las muestras en baño termostático de 25 ~ 27°C.



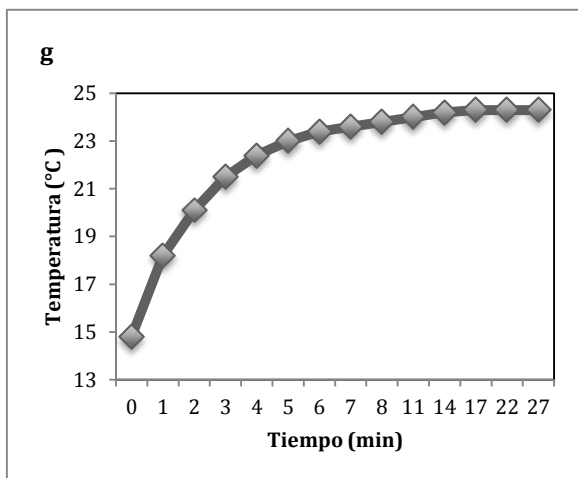


Figura 4 Evolución de la temperatura de la muestra en la celda de vidrio para cada temperatura ambiente. a)40 °C, b) 35 °C, c) 30 °C, d)25 °C, e)20 °C, f)15 °C y g)10 °C.

8.3 Comparación de lámparas

En este experimento se estudió si era necesario utilizar la lámpara de deuterio (UV), si las lecturas de absorbancias en los picos 434nm y 578nm tienen diferencias entre tratamientos y si el m-Cresol sufre algún tipo de degradación causada por la radiación UV (Carter et al., 2013). La metodología del experimento se encuentra en Anexo 1 Método 3. Las medias y las desviaciones estándar se presentan en el Anexo 2 Tabla 2 en donde se muestran en negritas los promedios más altos entre de las lecturas para cada longitud de onda. Se realizó un análisis de varianza de una vía con $\alpha=5\%$ y reveló diferencias significativas para ambos tratamientos con las dos longitudes de onda utilizadas, 434nm y 578nm. Los valores de $F(1,8)$ del análisis están mostrados en la Tabla 5, en todos los casos la F crítica= 11.25862 y $p<0.5$. Los resultados obtenidos indican que los tratamientos son diferentes entre si. Carter (2013) indica que el pH tiende a disminuir cuando se utilizan ambas lámparas en pH básicos porque la luz UV afecta a la especie I^{2-} pero no a la especie HI^- . Es recomendable que se hagan las mediciones con la lámpara de tungsteno.

Tabla 5 Valores de F para la comparación de tratamientos con lámpara UV/Vis y solo Visible con 1 gota de indicador.

pH potenciométrico	Valores de F	
	434nm	578nm
6.99	39,523.5	2,442.8
7.55	108.2	5,683.0
8.027	1,799.2	125.6
8.502	725,102.5	310,175.6
8.99	82,497.3	249,892.2

** F crítica para todos los casos igual a 11.25862

8.4 Comparación de volúmen de indicador

Con la realización de éste experimento determinamos qué cantidad de indicador es la más adecuada para la medición de las muestras en UV/Vis y sólo visible, cuántas gotas de indicador se tienen que utilizar en cada muestra de la celda fija para tener una óptima medición y si hubo diferencias en las mediciones hechas con una sola lámpara y con ambas lámparas, para un volumen de indicador determinado. La metodología se explica en el Anexo 1 Método 4. En el Anexo 2 Tablas 3 y 4 se muestran los promedios, las desviaciones estándar y coeficientes de variación de los resultados obtenidos en las longitudes de onda de los picos 434nm y 578nm con una, dos y tres gotas para cada uno de los pH con una sola lámpara (visible) y con UV/Vis, respectivamente. En negritas están señalados los promedios que se salen del intervalo de absorbancia de 0.4 a 1.0nm. Se realizaron Análisis de varianza de una vía para saber si existían diferencias significativas entre las absorbancias con 1, 2 y 3 gotas en el tratamiento con una lámpara y con UV/Vis y también se compararon los efectos de las lámparas entre las muestras con 1, 2 y 3 gotas. Se utilizó una $\alpha=5\%$ en todos los análisis realizados. Los valores de F se presentan en las Tabla 6 y Tabla 7. En todos los casos F crítica= 11.25862 y $p<0.05$ por lo que concluimos que si existen diferencias significativas entre los diferentes volúmenes de indicador utilizados.

Para decidir la cantidad de gotas utilizadas se tomó como referencia la recomendación de Dickson et al. (2007) de que la cantidad de indicador óptima es aquella que produce valores de absorbancia de entre 0.4 y 1.0 en cada uno de los dos picos de absorbancia. Para determinar qué cantidad de gotas produce los resultados que entran dentro del intervalo propuesto se promediaron los resultados obtenidos de las lecturas para cada muestra en cada uno de los picos (Anexo 2 Tablas 3 y 4). Las muestras con un menor número de promedios fuera del intervalo para ambos tratamientos con lámpara de visible y UV/Vis son las muestras con dos gotas. Aparentemente el aumento en la absorbancia a medida que se añade más indicador es lineal.

Tabla 6 Valores de F: tratamiento con 1 lámpara Visible y comparación de 1, 2 y 3 gotas. Notación: número de gotas- número de lámparas.

pH	Valores de F					
	434			578		
	1-1,2-1	1-1,3-1	2-1,3-1	1-1,2-1	1-1,3-1	2-1,3-1
6.99	2,246,167.1	2,139,688.6	399,207.2	1,281,046.1	3,245,527.2	3,321,272.3
7.55	321,494.6	232,817.02	30,469.6	277,867.2	284,161.0	31,498.9
8.027	271,159.0	1,946,655.5	2,696,742.0	201,669.3	1,405,734.8	3,221,200.3
8.502	2,394.5	3,699,821.7	5,848.4	11,266.1	6,959,770.9	18,342.2
8.99	1,600,740.4	2,355,073.9	55,561.6	4,164,846.4	1,683,451.2	37,463.0

** F crítica para todos los casos igual a 11.25862

Tabla 7 Valores de F: tratamiento con 2 lámparas UV/Vis y comparación de 1, 2 y 3 gotas. Notación: número de gotas-número de lámparas.

pH	Valores de F					
	434			578		
	1-2,2-2	1-2,3-2	2-2,3-2	1-2,2-2	1-2,3-2	2-2,3-2
6.99	12,359,055.6	5,770,940.9	2,006,785.5	5,991,739.3	12,004,545.1	3,721,550.3
7.55	1,888,953.1	40,828,497.8	3,288,572.3	1,156,127.0	9,523,590.4	2,197,680.1
8.027	1,449,785.6	3,933,353.7	2,180,307.6	1,015,362.3	3,583,452.0	1,512,432.6
8.502	12,939.8	19,318,541.7	15,646.4	35,088.6	10,430,289.8	32,950.0
8.99	214,432.3	1,591,771.7	505,591.8	6,989,881.5	1,685,779.4	643,296.1

** F crítica para todos los casos igual a 11.25862

8.5 Degradación del indicador en el tiempo

Se hicieron mediciones para observar la degradación del indicador a través del tiempo cada minuto, cada 10 minutos, cada hora y tras una semana.

8.5.1 Degradación cada minuto

Este experimento se realizó para saber si existe degradación del indicador a través del tiempo en periodos de 1 minuto por 10 minutos. La metodología del experimento se muestra en el Anexo 1 Método 5. En la Figura 5 se muestra el cambio de $[I^{2-}]/[HI^-]$ que presentaron las muestras cada minuto. Se observa que, en todos los casos, la degradación tiene una tendencia positiva y aumenta alrededor de 0.001 unidades de $[I^{2-}]/[HI^-]$ en el primer minuto con excepción de la Figura 5 en la que ocurre una disminución durante ese tiempo pero después, también aumenta en el tiempo.

8.5.2 Degradación cada 10 minutos

Con este experimento se pretendió saber si existe degradación del indicador a través del tiempo en periodos de 10 minutos por una hora. La metodología del experimento se encuentra en el Anexo 1 Método 6. En la Figura 6 se muestra el cambio de $[I^{2-}]/[HI^-]$ de cada muestra cada 10 minutos. En las dos primeras muestras (figura 5a y b) se observó una tendencia al aumento de $[I^{2-}]/[HI^-]$ en el tiempo, aunque, en los casos c, d y e la tendencia es inversa.

8.5.1 Degradación cada hora

Con éste experimento se buscó saber si hay diferencias en las mediciones realizadas cada hora a causa de la degradación del indicador. La descripción de la metodología del experimento está en el Anexo 1 Método 7. En la Figura 7 se muestran los valores

de $[I^{2-}]/[HI^-]$ que se obtuvieron a partir de los cálculos de las lecturas realizadas cada hora. La tendencia de degradación cada hora no fue tan homogénea como la degradación vista en intervalos de 10 minutos. En este casos de pH cercanos a la neutralidad (Figura 7a) ó pH básicos (Figura 7e), la tendencia fue a un aumento en los valores de $[I^{2-}]/[HI^-]$. Por otro lado, en pH cercanos a 8, la tendencia fue a una disminución en los valores de $[I^{2-}]/[HI^-]$ (Figura 7b, c y d).

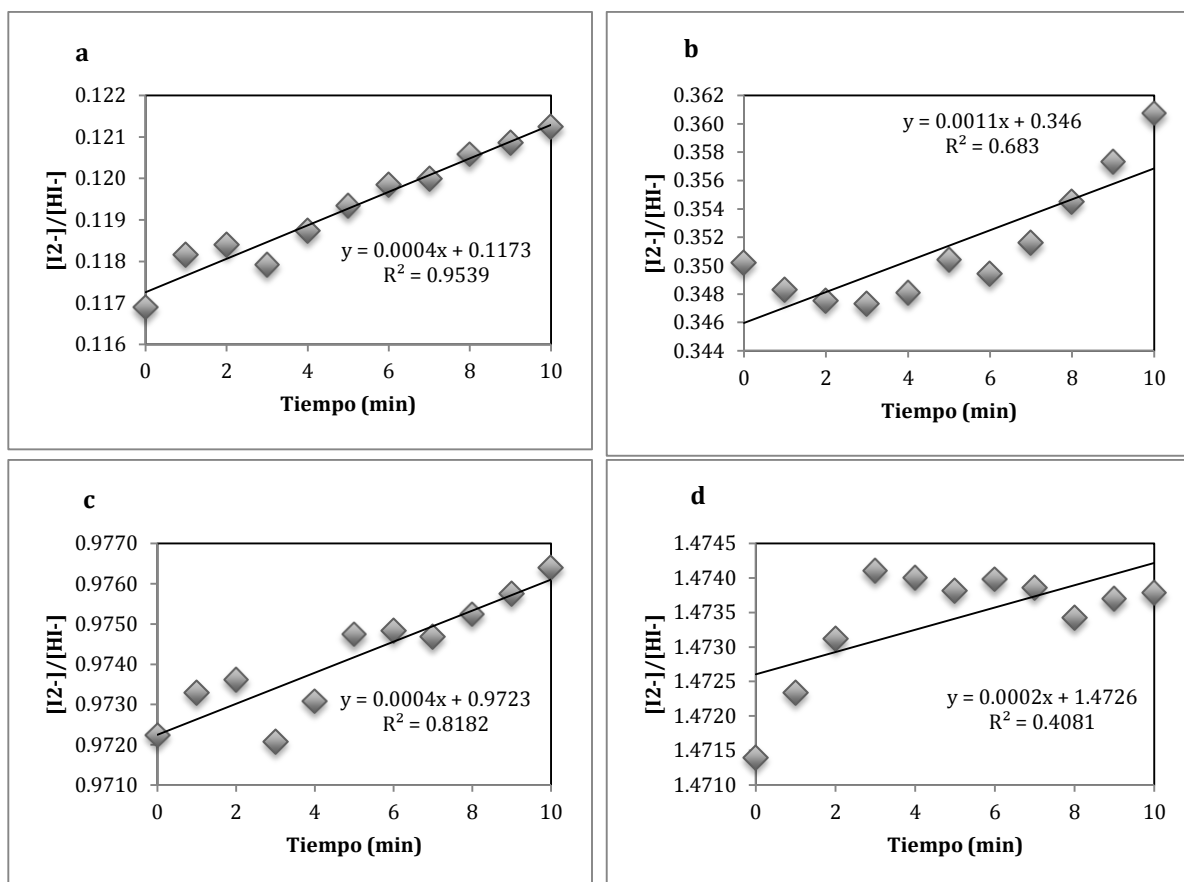


Figura 5 Comparación de los valores de $[I^{2-}]/[HI^-]$ calculados en periodos de cada 1 minuto por 10 minutos. a) 7.017, b) 7.503, c) 8.157 y d) 8.505

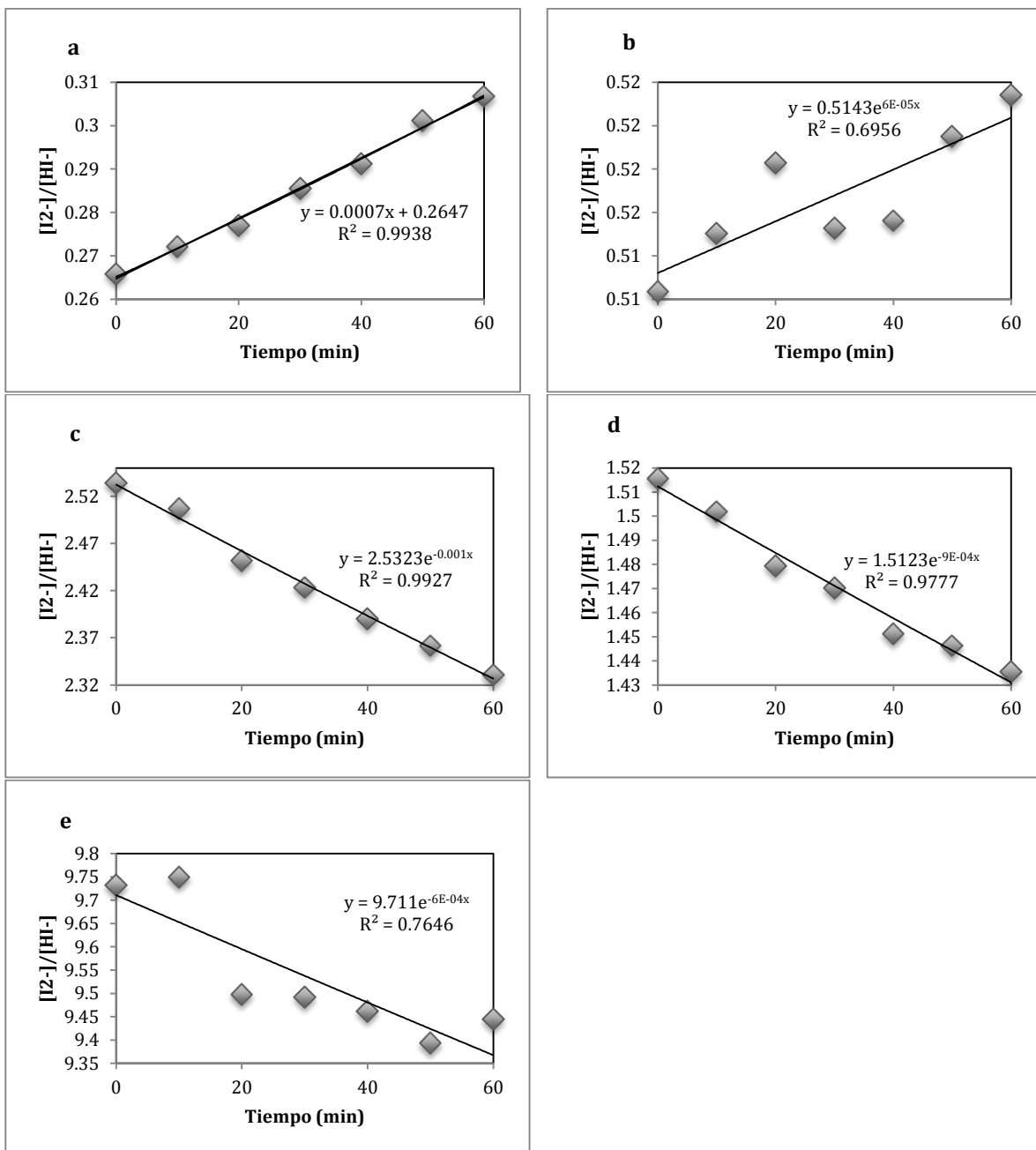


Figura 6 Comparación de los valores de $[I2^-]/[HI^-]$ calculados en periodos de cada 10 minutos, para diferentes pH: a) 7.457, b) 7.927, c) 8.212, d) 8.546 y e) 9.118

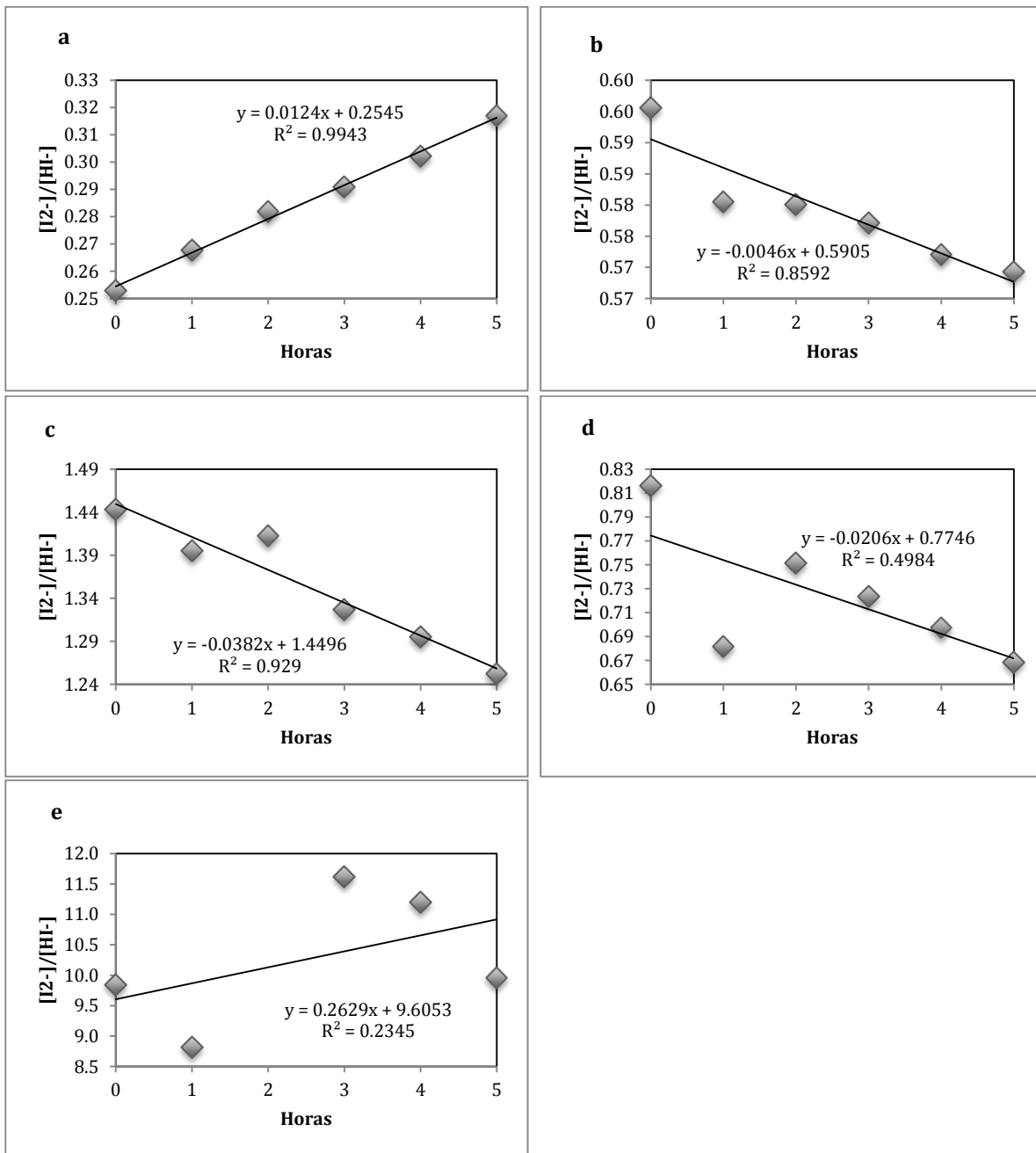


Figura 7 Valores de [I2-]/[HI-] para mediciones hechas cada hora durante 5 horas. a) 7.457, b) 7.927, c) 8.212, d) 8.546 y e) 9.118

8.5.2 Degradación después de una semana

Con éste último experimento de degradación se quiso cuantificar la diferencia en las mediciones de pH realizadas después de una semana de haber añadido el indicador a la muestra. La metodología se encuentra en el Anexo 1 Método 8.

En la Figura 8 se muestra la diferencia de valores de $[I^{2-}]/[HI^-]$ que se obtuvo entre el tiempo inicial y tras una semana de almacenamiento. Las muestras almacenadas por una semana después de añadido el indicador no presentaron cambios de coloración a simple vista. Sin embargo las medidas una disminución en los valores de $[I^{2-}]/[HI^-]$ calculados. Dickson et al. (2007) menciona que las muestras para pH deben ser analizadas inmediatamente pero, si es necesario, deben guardarse en un cuarto oscuro a temperatura ambiente y de preferencia herméticamente selladas. Tomando en cuenta los resultados obtenidos en los experimentos de degradación a través del tiempo no es recomendable ningún tipo de almacenamiento una vez que el indicador haya sido añadido y entre en contacto con la muestra ya que la degradación es evidente pasados algunos minutos. En caso de que sea necesario el almacenamiento de las muestras es recomendable que sea antes de añadido el indicador y que se evite el contacto de la muestra con la atmósfera para evitar el intercambio gaseoso.

En el Anexo 2 Tabla 5 se muestran las diferencias en $[I^{2-}]/[HI^-]$ de las mediciones realizadas a una misma muestra almacenada por una semana con y sin exposición previa a la luz. En el Anexo 2 Figura 1 se hace una compilación de los cambios ocurridos cada hora y los ocurridos después de una semana de contacto del indicador con la muestra. Se observa degradación en el tiempo en el Anexo 2 Figura 1a y e, la tendencia de la degradación de la muestra fue positiva mientras que para b, c y d la tendencia fue negativa.

Con los resultados obtenidos a partir de los experimentos de Degradación del indicador en el tiempo podemos concluir que sí existe degradación el indicador en el tiempo y que ésta ocurre inmediatamente después de que el indicador es puesto en contacto con la muestra. Por tanto, las lecturas deben realizarse lo más pronto posible y no se debe añadir el indicador si la muestra no va a ser medida de inmediato.

Es recomendable además que las muestras se expongan el menor tiempo posible a la luz. También es recomendable que se desechen las muestras con indicador una vez que ya hayan sido expuestas a la luz con el fin de evitar errores en la lectura por causa de la degradación por fotólisis.

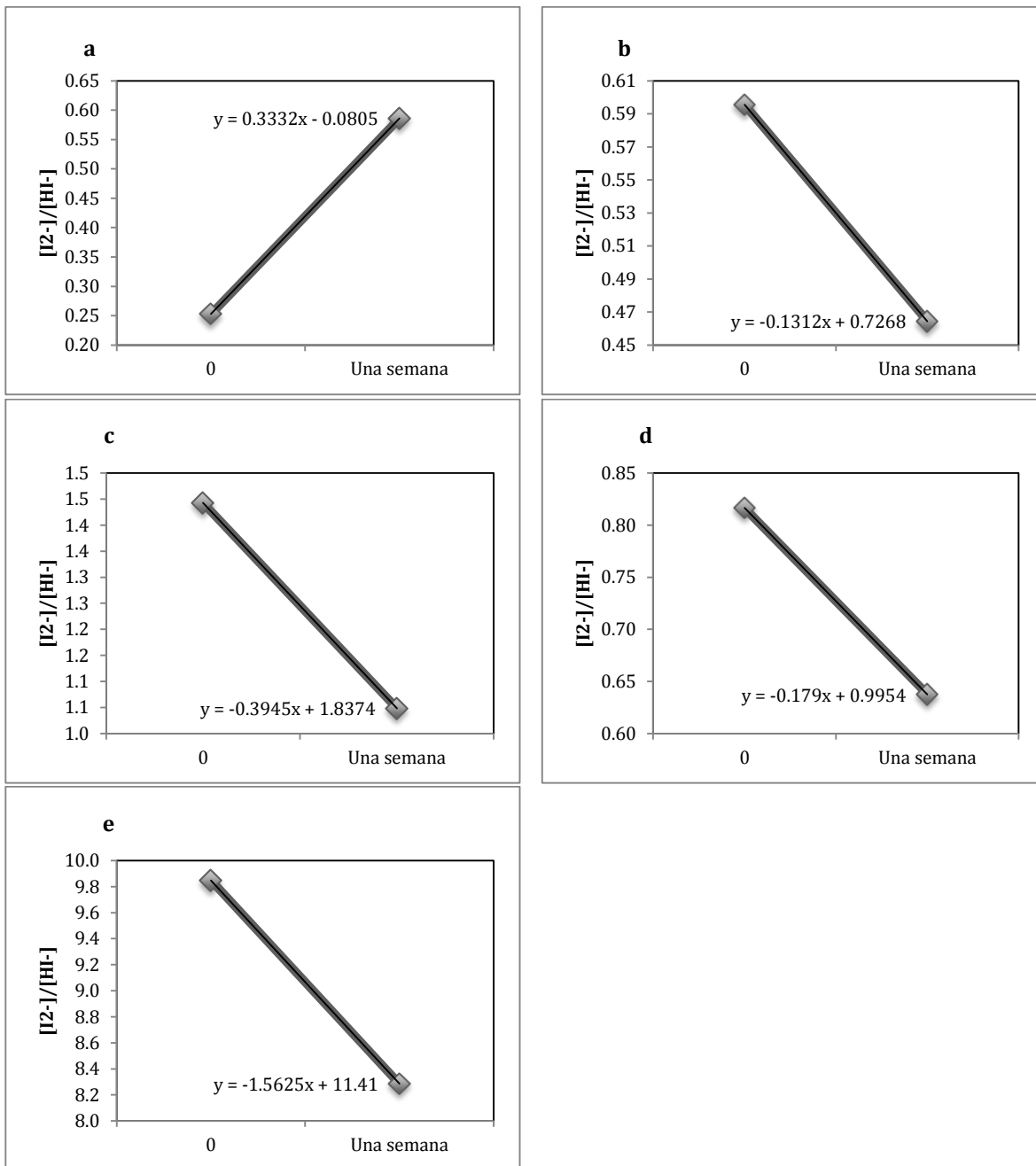


Figura 8 Comparación de valores de $[I2-]/[HI-]$ obtenidos en el tiempo cero y después de una semana de almacenamiento de la muestra con indicador a) 7.457, b) 7.927, c) 8.212, d) 8.546 y e) 9.118

8.6 Contribución del indicador

En este experimento se estudió la contribución que tiene la adición de m-cresol en el pH de las muestras para así poder determinar la corrección que debe hacerse a las medidas de pH calculado. La metodología se encuentra en el Anexo 1 Método 9. Por recomendación de Dickson et al. (2007) se utilizan 100µL de indicador de m-cresol.

La curva de pH con diferentes volúmenes de indicador está mostrada en la Figura 9. Se realizó una regresión lineal para conocer el valor de pH sin la adición de m-Cresol. Se observa que los valores de pH calculados aumentan a medida que se añade mayor cantidad de indicador, debido a su naturaleza ácido- base (Liu et al., 2011). En este caso, se observa que el m-cresol tiene una contribución positiva en los valores de pH calculados. El incremento de pH observado fue de 0.9 unidades. Consideramos que esta contribución es errónea ya que no concuerda con la reportada en la literatura de ~0.01-0.02 unidades de pH (Yao et al., 2007; Liu et al., 2011; Carter et al., 2013) el error puede deberse a la calidad o a las impurezas del m-Cresol. No se aplicó una corrección por adición de m-Cresol a los valores de pH.

Cabe mencionar que diferentes marcas de m-cresol presentan diferentes impurezas y por tanto, las correcciones dependen de la marca y concentración de m-Cresol. Es recomendable probar otras marcas de meta-Cresol púrpura y los procesos de purificación ya que los errores ocasionados por las impurezas del indicador son más significativos en la medición de pH en agua marina superficial (Yao et al., 2007; Liu et al., 2011).

8.7 Contribución del HgCl₂

Con este experimento se estudió la contribución por parte del HgCl₂ añadido a las muestras para su preservación. Le metodología se encuentra en el Anexo 1 Método 10. En la Figura 10 se muestran los valores de pH calculados para cada volumen de HgCl₂ añadido. No se observa una correlación entre los valores de pH obtenidos y el HgCl₂ añadido. Por tanto, podemos concluir que no existe una contribución del HgCl₂ añadido para la preservación de las muestras en el pH de las mismas y no es necesario realizar ningún tipo de corrección a los valores de pH por este motivo.

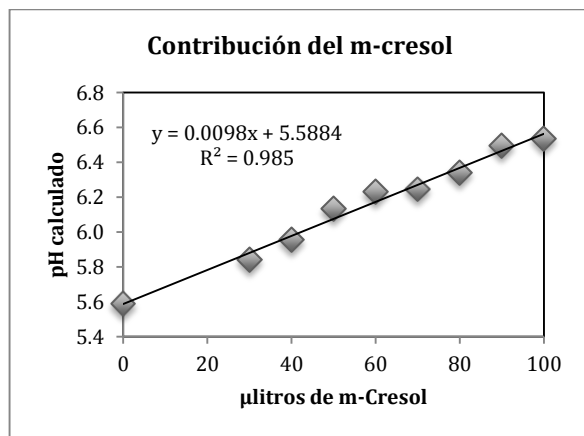


Figura 9 Curva de pH contra volumen de m-Cresol, AMA3.2

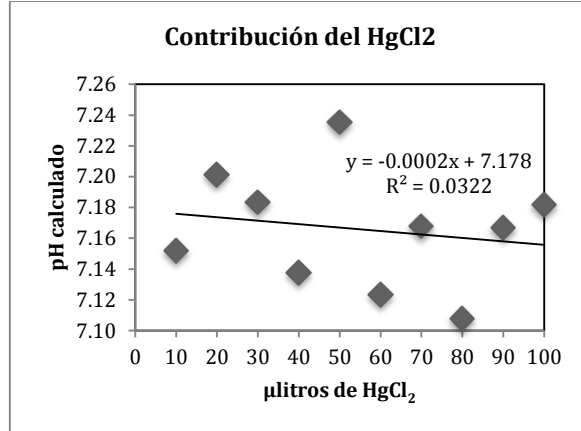


Figura 10 Curva de pH contra volumen de HgCl₂, AMA3.2 y m-Cresol.

8.8 Calibración con TRIS

Con este experimento se estableció una calibración puntual con TRIS. La metodología se encuentra en el Anexo 1 Método 11. La curva de calibración se muestra en la Figura 11. Se puede ver que los valores ajustados de las soluciones de TRIS difieren de aquellos obtenidos con el espectrofotómetro. Estas diferencias pueden ser debidas a las impurezas del m-Cresol.

En la Tabla 8 se muestran las diferencias obtenidas entre los valores de pH obtenidos con el cálculo de las lecturas y aquellos ajustados con TRIS. Asumiendo que el pH de muestras de agua de mar será próximo a 8 y utilizando la ecuación 18, se calculó la diferencia (-0.09 ± 0.05) como factor de calibración de las lecturas de pH. Para hacer la calibración de las medidas de pH, a los valores obtenidos de las lecturas realizadas con el espectrofotómetro se les suman 0.09 ± 0.05 unidades de pH.

Tabla 8 Diferencia entre los valores de pH ajustados con TRIS y los calibrados a partir de las lecturas

pH TRIS	pH calibrado	Diferencia
7.5	7.4718	-0.03
7.7	7.6396	-0.06
8	7.9134	-0.09 ± 0.05
8.3	8.2723	-0.03
8.5	8.4722	-0.03
	promedio	-0.05
	Des est	0.03

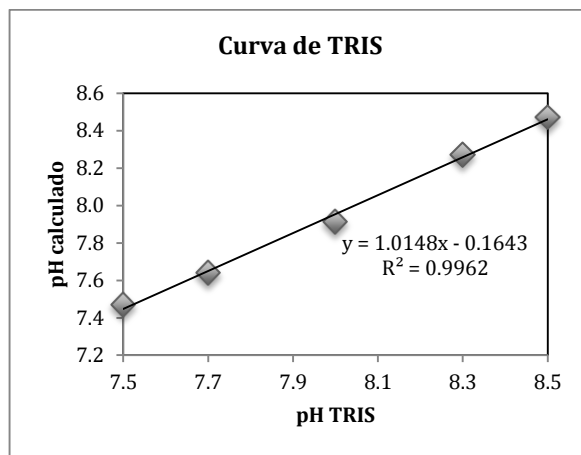


Figura 11 Curva de calibración de pH, valores medidos contra valores de pH ajustados con TRIS.

8.9 Reproducibilidad

Se estudió la reproducibilidad del método para la preparación de las muestras en celda y la lectura de las mismas con el espectrofotómetro. La metodología se encuentra en el Anexo 1 Método 12. Los valores de pH que se obtuvieron para cada repetición se presentan en la Tabla 9. Las desviaciones estándar de cada repetición fueron muy bajas y la desviación estándar de todos los valores de pH obtenidos en cada una de las repeticiones es de 0.001, indicando un alto nivel de reproducibilidad.

Tabla 9 Valores de pH medidos para cada repetición

Repetición	pHmedido	Desv est
1	7.7787	0.001
2	7.7779	0.0003
3	7.7795	0.0002
4	7.7796	0.0002
5	7.7790	0.0002
6	7.7776	0.0002
7	7.7791	0.0001
8	7.7792	0.0003
9	7.7786	0.0002
Promedio	7.7788	
Desv est	0.001	

8.10 pH en el Estero de Urías, Mazatlán

En este experimento se midió el pH de muestras de agua marina natural proveniente del Estero de Urías, Mazatlán, Sinaloa. La metodología del experimento se encuentra en el Anexo 1 Método 13. Los datos ambientales de cada una de las estaciones y los valores de pH calculados de cada una de las muestras se encuentran en la Tabla 10. Las medidas de salinidad de cada sitio se calcularon a partir de la conductividad y temperatura. Se observa que la salinidad aumenta a medida que se adentra más en el estero mientras que, el oxígeno disuelto (OD) y el pH disminuyen.

En la Figura 12 se muestran los valores de pH y OD. Se observa que ambos valores tienen una tendencia negativa. Si se realiza una correlación entre los valores de oxígeno disuelto y pH, Figura 13, se observa que a medida que aumenta la cantidad de oxígeno disuelto hay mayores valores de pH, y viceversa. La disminución en el OD y pH en el estero probablemente ocurre por la combinación de diversos factores estresantes naturales y antropogénicos. En el caso de los estresantes naturales se pueden mencionar la respiración biológica, la remineralización de la materia orgánica (causantes de hipoxia). Como estresantes antropogénicos se pueden mencionar las descargas urbanas, industriales y agrícolas. Todos estos factores estresantes actúan de manera sinérgica en los estuarios y causan cambios en las condiciones de pH, y los estados de saturación de la aragonita y oxígeno disuelto (Feely et al., 2010). La variabilidad de los valores de pH puede ser explicada por la variabilidad del oxígeno disuelto en un 77%.

Tabla 10 Datos ambientales y de pH en el Estero de Urías, Mazatlán 07/07/2015

Muestra/Estación	Temperatura (°C)	OD(mg L-1)	Salinidad	pH
1/01	25.58	8.52	28.60	8.02
2/02	25.47	8.33	28.61	8.02
3/03	23.76	6.19	28.96	7.90
4a/04	25.18	6.34	25.85	7.86
4b/04	25.18	6.34	25.85	7.86
4c/04	25.18	6.34	25.85	7.86
4d/04	25.18	6.34	25.85	7.87
4e/04	25.18	6.34	25.85	7.86
5/05	25.83	6.37	29.77	7.84
6/06	27.86	6	29.78	7.81
7/07	28.23	5.61	29.70	7.82
8/08	29.29	6.45	29.87	7.84
9/09	28.94	6.65	30.10	7.77
10/10	28.93	4.51	31.35	7.51

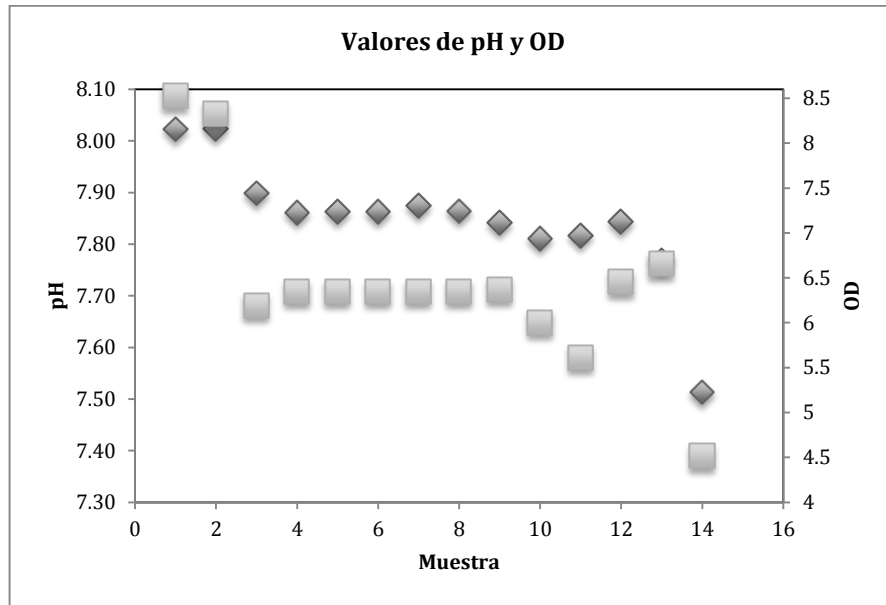


Figura 12 Valores de pH y OD de cada muestra (rombos valores de pH, cuadrados valores de OD)

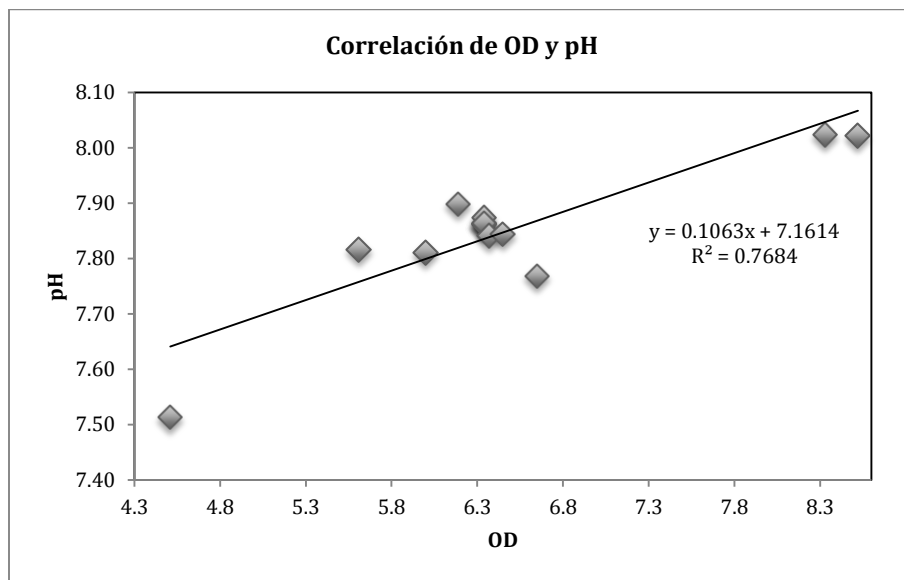


Figura 13 Correlación entre los valores de oxígeno disuelto y los valores de pH

8.11 Reproducibilidad del método

Con éste experimento se estudió la reproducibilidad de nuestro método con muestras de agua marina natural. La metodología se encuentra en el Anexo 1 Método 14. De 7 muestras medidas, el pH promedio (no calibrado) y la desviación estándar fueron de 7.773 ± 0.003 , que indica un alto nivel de reproducibilidad.

Tabla 11 Valores de pH medido de la muestra 4c

	pH medido
	7.771
	7.775
	7.773
	7.774
	7.774
	7.775
	7.766
Promedio	7.773
Desv est	0.003

9. Discusión

La acidificación oceánica ha venido ocurriendo desde que la concentración de CO₂ atmosférico comenzó a incrementarse como consecuencia del inicio la revolución industrial y la intensificación de las actividades antropogénicas que vinieron con ella (Ries et al., 2009; Doney et al., 2009; Fabry et al., 2008). Al disolverse el dióxido de carbono en el agua ocurren una serie de reacciones que alteran la química acuática por ejemplo, la disminución del pH, aumento de la alcalinidad total y disminución de los estados de saturación del carbonato de calcio por lo tanto, se dificulta la disponibilidad de los iones de carbonato necesarios para que los organismos calcificadores formen sus conchas y esqueletos (Doney et al., 2009; Fabry et al., 2008; Feely et al., 2004; Anthony et al., 2008; Orr et al., 2005; Ries et al., 2009; Brewer, 1997).

Al estar sumergidos en el medio, los organismos marinos tienen una estrecha relación con la química acuática y dependen de que los estados de saturación del carbonato de calcio, calcita y aragonita, sean lo suficientemente altos es decir, > 1.0 para que sean capaces de formar adecuadamente sus conchas y esqueletos, característica que se presenta en diversos phyla animales y en algunas algas (Fabry et al., 2008; Ries et al., 2009). Sin embargo, la acidificación oceánica vuelve corrosiva al agua y por consiguiente la formación y estructura de esos mecanismos de protección se ven comprometidos (Fabry et al., 2008; Doney et al., 2009).

Estudios previos en laboratorio y mesocosmos sugieren que a valores aumentados de pCO₂ y valores disminuidos en la concentración de carbonato, el

estado de saturación del carbonato de calcio y los valores de pH, la mayoría de los organismos calcificadores exhiben una calcificación reducida, entre los que se incluyen protistas, algas, cnidarios, anélidos, moluscos, artrópodos y equinodermos (Doney et al., 2009; Feely et al., 2004; Orr et al., 2005; Ries et al., 2009; Miller et al., 2009).

Se han hecho estudios previos con protistas cocolitofóridos y se ha visto que reaccionan de manera variada y no uniforme a condiciones elevadas de CO₂ y aparentemente, las respuestas dependen de cada especie (Miller et al., 2009; Doney et al., 2009). Feely et al. (2004) trabajó con las especies *Emiliana huxleyi* y *Gephyrocapsa oceanica* y observó una disminución en la calcificación de ambas especies (de 25 y 46% respectivamente) cuando fueron expuestas a un ambiente con una concentración de pCO₂ de tres veces los valores preindustriales es decir, 750 p.p.m.v.. Sin embargo, estos resultados contrastan con aquellos obtenidos por Iglesias- Rodríguez et al. (2008) en los que, con la especie *E. Huxleyi* bajo la misma concentración de pCO₂ presentó tasas de fotosíntesis y calcificación duplicadas. Cosa similar ocurre cuando se comparan las respuestas de las especies *Coccolitus pelagicus* y *Calcidiscus leptoporus* en este caso, *C. Pelagicus* no exhibió cambios significantes en sus tasas de calcificación cuando se le expuso a niveles de pCO₂ de 150 a 915 ppmv por otro lado, la especie *Calcidiscus leptoporus* fue muy sensible tanto a la disminución como al aumento en los niveles de pCO₂ y en ambos casos presentó tasas de calcificación reducidas y malformaciones en el cocolito (Doney et al., 2009). Los protistas foraminíferos planctónicos de las especies *Orbulina universa* y *Globigerinoides sacculifer* tienen una disminución en el peso de sus conchas como consecuencia de una concentración de carbonato reducida (Fabry et al., 2008; Doney et al., 2009).

Para el estudio del efecto de la insaturación en los pterópodos, Orr et al. (2005) planteó un escenario de CO₂ atmosférico para el año 2100 en el que la concentración sería de 788 p.p.m.v.. Bajo las condiciones propuestas por este escenario, estudió el efecto que tiene la disminución de la profundidad del horizonte de saturación de la aragonita en la concha de la especie *Clio pyramidata* y observó que en cuanto la especie fue expuesta a condiciones de insaturación con respecto a la aragonita, presentó una marcada disolución de la concha a las 48 horas de haber sido expuesta, respuesta que se relaciona con las características altamente aragoníticas de la concha de los pterópodos y que las hacen particularmente sensibles a la acidificación (Fabry et al., 2008).

Los foraminíferos y pterópodos presentan una reducción en la calcificación a medida que aumenta el pCO₂ y disminuye el estado de saturación del carbonato de calcio de la superficie oceánica y se ven obligados a secretar estructuras con menos contenido de calcio o más delgadas e induce adaptaciones en su reproducción (Responses to EPA, n.d.; Fabry et al., 2008; Doney et al., 2009). Los cambios en los horizontes de saturación y la concentración de pCO₂ también afectan la ecología de los organismos por ejemplo, si los pterópodos no son capaces de adaptarse lo suficientemente rápido a las condiciones de insaturación, es probable que desaparezcan de las regiones polares y árticas o que tengan que migrar a aguas de latitudes más bajas que permanezcan sobresaturadas con respecto a la aragonita y que como consecuencia, la estructura y biodiversidad de los ecosistemas polares se alteren (Orr et al., 2005).

Ries et al (2009) realizó una serie de experimentos de laboratorio en los que comparó el efecto que tiene la acidificación oceánica en algas coralinas rojas, algas calcáreas verdes, cnidarios, anélidos, bivalvos, gastrópodos, crustáceos y equinodermos. Los resultados obtenidos fueron variados y se determinaron 6 patrones de respuesta de la calcificación siendo 1) positiva en el cangrejo *Callinectes sapidus* y el camarón *Penaeus plebejus*, 2) mantenida- positiva (sin cambio en pCO₂ intermedio, positiva con alto pCO₂) en la langosta *Homarus americanus*, 3) parabólica (positiva en pCO₂ intermedio, negativa en alto pCO₂) en la lapa *Crepidula fornicada*, el erizo morado *Arbacia punctulata*, la alga roja coralina *Neogoniolithon sp.* y la alga calcárea verde *Halimeda incrassata*, 4) neutral en el mejillón *Mytilus edulis*, 5) mantenida- negativa (sin cambio en pCO₂ intermedio, negativa con alto pCO₂) en el coral templado *Oculina arbuscula*, el erizo de lápiz *Eucidaris tribuliodes*, la almeja dura *Mercenaria mercenaria* y el caracol *Stombus alatus*, 6) negativa en el gusano serpúlido *Hydrioides crucigera*, el caracolillo *Littorina littorea*, la vieira *Argopecten irradians*, la ostra *Crassostrea virginica*, el caracol *Urosalpinx cinerea* y la almeja *Mya arenaria*.

Los resultados de Ries et al. (2009) muestran que la mayoría de los organismos presentaron calcificación negativa en valores altos de pCO₂. La respuesta de los animales y algas a la acidificación oceánica es muy variada y es específica del tipo de organismo, incluso cuando están cercanamente relacionados (Miller, Reynolds, Sobrino, & Riedel, 2009). Por otro lado, Miller et al. (2009) realizó experimentos con larvas de las especies de ostras *Crassostrea Virginica* y *C. ariakensis* y encontró que en condiciones de insaturación con respecto a la aragonita las larvas crecieron y se desarrollaron bien sin malformaciones aparentes, estas diferencias muestran que la respuesta a los valores elevados de pCO₂ de los organismos es diferente entre los estadios larvales y adultos.

La tasa de calcificación no es lo único que se ve afectado por la acidificación, en las algas la tasa de reclutamiento disminuye pero es posible que la tasa fotosintética aumente. En los corales se observa un decremento en la habilidad para resistir fuerzas erosivas e hidrodinámicas y se alteran las propiedades de propagación de luz del esqueleto para la fotosíntesis y se incrementa la tasa de fragmentación, en los corales como en los moluscos, crustáceos y equinodermos se observa que se retarda la edad de madurez sexual, se altera la producción de gametos, el desarrollo y tamaño larval (estadio en el que son particularmente sensibles a la acidificación) y también aumenta su mortalidad (Responses to EPA, n.d.; Doney et al., 2009; Fabry et al., 2008; Ries et al., 2009; Anthony et al., 2008)).

A medida que los niveles de CO₂ atmosférico aumenten, los organismos tendrán que soportar condiciones que nunca se han experimentado en la historia geológica reciente y que pueden causar cambios en la diversidad y estructura de las comunidades y ecosistemas pues, si los organismos no pueden adaptarse a los cambios en la química acuática, deberán cambiar sus zonas de distribución o extinguirse (Doney et al., 2009; Responses to EPA, n.d.; Miller et al., 2009; Orr et al., 2005). Por ejemplo, si se extinguen los pterópodos de las zonas polares y subpolares, se comprometerá la dieta de depredadores como zooplancton (Gymnosomata) y vertebrados como peces linterna (myctophidae), peces árticos (notothenioidei), salmón del pacífico norte, jureles, bacalao y ballenas barbadas y como consecuencia, la

supervivencia de ellos también se verá comprometida (Orr et al., 2005; Doney et al., 2009).

La mayoría de los estudios se han enfocado en los efectos de la acidificación en ambientes marinos sin embargo, también es importante que se consideren las zonas costeras y estuarinas ya que son particularmente afectadas por estresores antropogénicos y en estas, la acidificación interactúa con otros procesos ambientales naturales y antropogénicos que pueden aumentar la velocidad de la disminución de pH y de los estados de saturación de las especies de carbonato (Feely et al., 2010; Duarte et al., 2013).

Feely y su equipo (2010) estudiaron los efectos de la acidificación oceánica en conjunción con procesos naturales y antropogénicos en el estero de Puget Sound, Washington, Estados Unidos y encontraron que alrededor del 24 – 49% de la disminución del pH se debía a la acidificación oceánica y que el porcentaje restante se relacionaba con procesos de respiración que inducen hipoxia y disminuyen los valores de pH y saturación de la aragonita. Los procesos de respiración están promovidos por la entrada de sedimentos, materia orgánica, nutrientes y contaminantes asociados a actividades industriales, combustión de combustibles fósiles, prácticas agrícolas y urbanas (Feely et al., 2010; Cardoso- Mohedano J. G., 2004).

Los ecosistemas costeros contienen múltiples hábitats que juegan un papel fundamental en la construcción y mantenimiento de las condiciones físicas y químicas del ecosistema y brindan servicios ecosistémicos como protección física, regulación de agua, tratamiento de residuos, ciclos de nutrientes, recursos alimenticios y refugio a peses y mariscos (Cardoso- Mohedano et al., 2015). Estos ecosistemas son variados e incluyen hábitats costeros con vegetación como pastizales salinos y estepas continentales halófitas, y hábitats como arrecifes, playas arenosas, marismas, lagunas costeras, entre otros (Templado et al., 2009; Duarte et al., 2013). Todas las comunidades en estos hábitats llevan a cabo intensos procesos metabólicos que incluyen, altas tasas de producción primaria, respiración y tasas de calcificación por lo que afectan las concentraciones de CO_2 , CO_3^- y alcalinidad (Duarte et al., 2013).

Feely et al. (2010) enumera algunos estudios que sugieren que a) especies de peces juveniles y mariscos de importancia económica en regiones costeras son altamente sensibles a concentraciones de CO_2 más altas que las normales y presentan tasas de mortalidad más altas a mayor concentración de CO_2 , b) existe incidencia de casos de muertes en masa de larvas en criaderos de ostras en el noroeste del pacífico que fueron causadas por aguas ricas en CO_2 y nutrientes que contenían la bacteria patogénica *Vibrio tubiashii* y c) aumento en abundancia de diatomeas del género *Pseudonitzschia* que crecen en aguas cálidas y ricas en CO_2 y que a su vez, favorecen florecimientos de algas dañinas. En la costa pacífico de los Estados Unidos también se ha detectado que en 7 años no ha habido reclutamiento de la especie de ostra *G. Gigas* en zonas en donde se había establecido previamente en poblaciones naturalizadas (Miller et al., 2009).

Los estuarios y zonas costeras presentan un estatus único con respecto a la acidificación oceánica y el patrón que siguen no es el mismo que ocurre en el océano abierto debido a que el pCO_2 en las aguas costeras no está necesariamente en equilibrio con la atmósfera e incluso hay casos en los que el ecosistema costero emite CO_2 a la atmósfera (Duarte et al., 2013; Feely et al., 2010). Los procesos de

enriquecimiento natural y antropogénico de nutrientes que ocurren en las zonas costeras, aunados a la heterogeneidad natural espacial y temporal de la salinidad, alcalinidad, pCO_2 y pH causan estrés ambiental en la biota calcificadora e incrementan la productividad y subsecuente remineralización de la materia orgánica llevando a estados de hipoxia y bajos niveles de pH en el agua (Duarte et al., 2013; Feely et al., 2010; Miller et al., 2009).

Debido a los efectos que tiene la acidificación en los ecosistemas marinos y costeros así como también en los organismos que los habitan es que las mediciones de pH de agua de mar deben de hacerse de la manera más precisa y confiable posible. La potenciometría se ha utilizado con anterioridad pero, es una técnica que presenta varias inconveniencias (Robert- Baldo et al. 1985; Dickson A. G., 1993; Schuster et al., 2009; Duarte et al., 2013).

En la presente tesis se optimizó y propuso un método espectrofotométrico como método para la medición de pH debido a las ventajas que dicha técnica presenta sobre la espectrofotometría y la alta precisión que puede alcanzarse de ± 0.001 unidades de pH (Dickson A. G., 1993; Clayton & Byrne, 1993; Robert- Baldo et al., 1985; Yao et al., 2007; Byrne & Breland, 1989). Las muestras a las que se les realizaron mediciones de pH con el método desarrollado provienen del Estero de Urías, Mazatlán, México. Dicho estero es una laguna costera sub-tropical y está localizado cerca de la ciudad de Mazatlán y tiene actividades antropogénicas como los son una zona portuaria, una planta termoeléctrica, actividades agrícolas, pesqueras y de producción camaronera en granjas (Cardoso- Mohedano J. G., 2004; Cardoso- Mohedano et al., 2015).

Además de las muestras de agua del estero que fueron utilizadas para la medición de pH, también se obtuvieron datos de temperatura, oxígeno disuelto y salinidad (calculadas a partir de la conductividad). La temperatura tanto como la salinidad aumentaron a medida que se entró en el estero (S‰ de 28.60 a 31.35 y T°C de 25.58 a 28.93), estos datos corresponden a los reportados por Cardoso- Mohedano (2004) en el estero de Urías y puede que se deban a que el estero no recibe agua dulce de manera continua entonces, en las épocas de secas la evapotranspiración excede al suministro de agua dulce y causa un gradiente de salinidad que aumenta de la zona conectada con el océano hacia adentro del estero (Cardoso- Mohedano et al., 2015). Por otro lado, los valores de oxígeno disuelto fueron disminuyendo a lo largo del transecto esto puede deberse a las descargas de materia orgánica provenientes de la granja camaronera que está situada al fondo del estero y que causan un incremento en la descomposición y ambientes anóxicos (Cardoso- Mohedano J. G., 2004).

Los valores de pH de las muestras obtenidas del transecto realizado en el Estero de Urías presentan un gradiente que va de pH 8.02 en las estaciones 01 y 02 (fuera del estero) a pH 7.51 en la estación 10, al fondo del estero. La disminución en el pH está asociada a la disminución en el OD dentro del estero, ambas disminuciones pueden deberse a la respiración biológica, a la degradación de materia orgánica y posiblemente, a la contaminación antropogénica del estero (Feely et al., 2010, Cardoso- Mohedano et al., 2015).

El estudio de las condiciones ambientales en el océano y en los hábitats costeros debe ser abordado de manera holística es decir, considerando los procesos físicos, químicos y biológicos que ocurren y su interrelación ya que de no hacerlo así

se podrían dejar de considerar factores importantes que estén influyendo en el objeto de estudio. Ejemplo de esto es la acidificación oceánica que es un proceso químico que a su vez afecta a los organismos marinos y consecuentemente a los ecosistemas y su biodiversidad. Para poder hacer un análisis adecuado del efecto de la acidificación en los organismos, es necesario entender el proceso de acidificación desde la base química del mismo y para lograrlo, son necesarias técnicas y prácticas adecuadas que permitan medir la salinidad, temperatura, alcalinidad total, $p\text{CO}_2$ y pH de agua de mar. En el presente trabajo se desarrolló una técnica espectrofotométrica que permite medir el valor de pH de muestras de agua de mar para que posteriormente esos datos puedan ser de utilidad en estudios sobre el efecto de la acidificación en los organismos, los ecosistemas marinos y las pesquerías, incluyendo modelos de procesos biogeoquímicos y respuestas de niveles tróficos altos (Fabry et al. 2008; Doney et al. 2009).

Por último, es necesario que se intensifiquen los estudios en el agua marina de latitudes altas en zonas polares y subpolares ya que es prioritaria para la investigación debido a su fragilidad y propensión a experimentar los mayores cambios en la química de carbonatos y los horizontes de saturación de la calcita y aragonita para finales del siglo (Orr et al., 2005; Fabry et al., 2008). La acidificación también afectará la dinámica biogeoquímica nitrógeno y fósforo en el océano así como también, la especiación química de los metales traza, elementos traza y materia orgánica disuelta del agua marina por tanto, es indispensable la generación de datos que permitan monitorear la dinámica biogeoquímica de los océanos (Doney et al., 2009).

Es necesario que se realicen más estudios sobre el efecto que tiene la acidificación en zonas costeras con importancia económica o alta biodiversidad así como también en zonas con producción pesquera ya que los efectos interactivos y las retroalimentaciones que ocurren con el cambio de la química acuática del CO_2 junto con otros estresores como el calentamiento, la eutrofización, las especies introducidas y la sobrepesca pueden actuar conjuntamente y alterar la respuesta de los ecosistemas a los estresores particulares (Fabry et al., 2008; Orr et al., 2005).

10. Conclusiones

Para obtener el grado de precisión alcanzado, las mediciones deben realizarse utilizando la lámpara de luz visible, la celda fija, las muestras deben de mantenerse en un baño termostático en una temperatura ≥ 25.0 °C, se deben utilizar dos gotas de indicador de m-Cresol púrpura 2mM con pH ajustado a 8.0 ± 0.1 y éste debe ser añadido inmediatamente antes de realizar las lecturas para evitar degradación

Se requiere realizar una corrección a los valores de pH calculado de +0.09 unidades de pH, probablemente debido a la posible contribución de las impurezas del m-Cresol a los valores de pH. Se recomienda probar otras marcas de m-Cresol púrpura y, de ser posible, purificarlo para disminuir su contribución a los valores de pH de la muestra. No es necesario hacer correcciones por la adición de indicador ni por la adición de HgCl_2 para la preservación de las muestras.

Es necesario realizar una calibración de los valores de pH obtenidos con la lectura. Para realizar la calibración se deben sumar 0.09 ± 0.05 unidades de pH a los valores de pH obtenidos de la lectura. El método presenta una alta reproducibilidad (desviación estándar de 0.001 en agua marina artificial y 0.003 en agua marina natural).

11. Trabajos citados

- Anthony, K., Kline, D. I., Diaz-Pulido, G., Dove, S., & Hoegh-Guldberg, O. (2008). Ocean acidification causes bleaching and productivity loss in coral reef builders. *PNAS* , 105 (45), 17442-17446.
- Bellerby, R. G., Turner, D. R., Millward, G. E., & Worsfold, P. J. (1995). Shipboard flow injection determination of sea water pH with spectrophotometric detection. *Analytica Chimica Acta* , 259-270.
- Brewer, P. G. (1997). Ocean chemistry of the fossil fuel CO₂ signal: The haline signal of "business as usual". *Geophysical research letters* , 24 (11), 1367-1369.
- Byrne, R. H., & Breland, J. A. (1989). High precision multiwavelength pH determinations in seawater using cresol red. *Deep Sea Research Part A. Oceanographic Research Papers* , 36 (5), 803-810.
- Caldeira, K., & Wickett, M. E. (2003). Anthropogenic carbon and ocean pH. *Nature* , 425, 365.
- Cardoso- Mohedano, J. G. (2004). *Impacto de la Descarga de Efluentes de los Estanques de Cultivo de Camarón en un Complejo Lagunar (Estero de Urías, Mazatlan, Sinaloa, México) con y sin Influencia del Dragado. (Tesis de Maestría)*. México: Universidad Nacional Autónoma de México.
- Cardoso- Mohedano, J., Bernadello, R., Sánchez- Cabeza, J., Molino- Minero- Re, E., Ruiz- Fernández, A., & Cruzado, A. (2015). Accumulation of conservative substances in a sub-tropical coastal lagoon. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* , 164, 1-9.
- Carter, B. R., Radich, J. A., Doyle, H. L., & Dickson, A. G. (2013). An automated system for spectrophotometric seawater pH measurements. *Limnol. Oceanogr.: Methods* , 11, 16-27.
- Chemiasoft. (s.f.). *Chemiasoft Develop Yourself*. Obtenido de Salinity Calculator: http://www.chemiasoft.com/chemd/salinity_calculator
- Clayton, T. D., & Byrne, R. H. (1993). Spectrophotometric seawater pH measurements: total hydrogen ion concentration scale calibration of m-cresol purple and at-sea results. *Deep Sea Research Part I: Oceanographic Research Papers* , 40 (10), 2115-2129.
- DelValls, T. A., & Dickson , A. G. (1998). The pH of buffers based on 2-amino-2-hydroxymethyl-1,3-propanediol ('tris') in synthetic sea water. *Deep-Sea Research I* , 45, 1541-1554.
- Dickson , A. G., Sabine, C. L., & Christian, J. R. (2007). *Guide to best practices for ocean CO₂ measurements*.
- Dickson, A. G. (1993). pH buffers for sea water media based on the total hydrogen ion concentration scale. *Deep sea research part I: Oceanographic research papers* , 40 (1), 107-118.
- Dickson, A. G. (1993). The measurement of sea water pH. *Marine Chemistry* , 44 (2), 131-142.
- Dickson, A. G., Sabine, C. L., & Christian, J. R. (2007). SOP 6b. Determination of the pH of seawater using the indicator dye m-cresol purple. (A. G. Dickson, C. L. Sabine, & J. R. Christian, Edits.) *Ver. 1.01 Jan 28, 2009*.

- Doney, S. C., Fabry, V. J., Feely, R. A., & Kleypas, J. A. (2009). Ocean Acidification: The Other CO₂ Problem. *Annual Review of Marine Science*, 1, 169-92.
- Duarte, C. M., Hendriks, I. E., Moore, T. S., Olsen, Y. S., Steckbauer, A., Ramajo, L., Carstensen, J., Trotter, J. A., McCulloch, M. (2013). Is Ocean Acidification an Open-Ocean Syndrome? Understanding Anthropogenic Impacts on Seawater pH. *Estuaries and Coasts*, 36, 221-236.
- Fabry, V. J., Seibel, B. A., Feely, R. A., & Orr, J. C. (2008). Impact of ocean acidification on marine fauna and ecosystem processes. *ICES Journal of Marine Science: Journal du Conseil*, 65 (3), 414-432.
- Feely, R. A., Alin, S. R., Newton, J., Sabine, C. L., Warner, M., Devol, A., Krembs, C.; Maloy, C. (2010). The combined effects of ocean acidification, mixing, and respiration on pH and carbonate saturation in an urbanized estuary. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* (88), 442-449.
- Feely, R. A., Doney, S. C., & Cooley, S. R. (2009). Ocean Acidification Present Conditions and Future Changes in a High-CO₂ World. *Oceanography*, 22 (4), 36-47.
- Feely, R. A., Sabine, C. L., Lee, K., Berelson, W., Kleypas, J., Fabry, V. J., Millero, F. J. (2004). Impact of Anthropogenic CO₂ on the CaCO₃ System in the Oceans. *Science*, 305 (5682), 362-366.
- Iglesias- Rodríguez, M. D., Halloran, P. R., Rickaby, R. E., Hall, I. R., Colmenero- Hidalgo, H., Gittins, J. R., Green, D. R. H., Tyrrel, T., Gibbs, J. S., Von Dassow, P., Rehm, E., Armbrust, E. V., Boessenkool, K. (2008). plankton Calcification in a High-CO₂ World. *Science*, 320 (5874), 336-340.
- Institution, W. H. (24 de 09 de 2012). *The chemistry of ocean acidification*. Recuperado el 15 de 02 de 2015, de Ocean acidification: <http://www.whoi.edu/OCB-OA/page.do?pid=112136>
- Kester, D. R., Duedall, I. W., Connors, D. N., & Pytrowicz, R. M. (1967). Preparatio of Artificial Seawater. *Lymnology and oceanography*, 12 (1), 176-179.
- Le Quéré, C., Takahashi, T., Buitenhuis, E. T., Rödenbeck, C., & Sutherland, S. C. (2010). Impact of climate change and variability on the global oceanic sink of CO₂. *Global Biogeochemical Cycles*, 24 (4).
- Liu, X., Patsavas, M. C., & Byrne, R. H. (2011). Purification an characterization of meta-Cresol Purple for spectrophotometric seawater pH measurements. *Environmental Science & Technology* (45), 4862-4868.
- m-Cresol Purple. (s.f.). 857890 - m-Cresol Purple. Recuperado el 22 de 12 de 2014, de SIGMA-ALDRICH: <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sial/857890?lang=es®ion=MX>
- Mikaloff Fletcher, S. E., Gruber, N., Jacobson, A. R., Doney, S. C., Dutkiewicz, S., Gerber, M., Follows, M., Joos, F., Lindsay, K., Menemenlis, D., Mouchet, A., Müller, S. A., Sarmiento, J. L. (2006). Inverse estimates of anthropogenic CO₂ uptake, transport, and storage by the ocean. *Global Biochemical Cycles*, 20 (2).
- Miller, A. W., Reynolds, A. C., Sobrino, C., & Riedel, G. F. (2009). Shellfish Face Uncertain Future in High CO₂ World: Influence of Acidification on Oyster Larvae Calcification and Growth in Estuaries. *PLoS ONE*, 4 (5).
- Millero, F. J., Zhang, J.-Z., Fiol, S., Sotolongo, S., Roy, R. N., Lee, K., Mane, S. (1993). The use of buffers to measure de pH of seawater. *Marine Chemistry*, 44, 143-152.

- Myers, R. (2003). *The Basics Of Chemistry*. Westport, CT, USA: Greenwood Publishing Group, Inc.
- Nemzer, B. V., & Dickson, A. G. (2005). The stability and reproducibility of Tris buffers in synthetic seawater. *Marine Chemistry*, 96, 237-242.
- Oceánica, G. d. (2009). Acidificación oceánica: Los hechos. Una guía introductoria especial para asesores y gestores. 12. (D. d. Laffoley , & J. M. Baxter, Edits.) Proyecto Europeo Sobre la Acidificación Oceánica (EPOCA).
- Orr, J. C., Fabry, V. J., Aumont, O., Bopp, L., Doney, S. C., Feely, R. A., Gnanadesikan , A., Gruber, N., Ishida, A., Joos, F., Key, R. M., Lindsay, K., Maier-Reimer, E., Matear, R., Monfray, P., Mouchet, A., Najjar, R. G., Plattner, G.-K., Rodgers, K. B., Sabine, C. L., Sarmiento, J. L., Schlitzer, R., Slater, Richard D., Totterdell, Ian J., Weirig, M.-F., Yamanaka, Y., Yool, A. (2005). Anthropogenic ocean acidification over the twenty-first century and its impact on calcifying organisms. *Nature*, 437 (29), 681-686.
- Prichard, E. (2003). *Practical laboratory skills training guides: Measurement of pH*. Cambridge, UK: LGC.
- Responses to EPA. (n.d.). Responses to EPA Notice of Data Availability From Ocean Carbon and Biogeochemistry Program Items in Blue are original questions posed by EPA. OCB RESPONSE.
- Riebesell, U., Fabry, V. J., Hansson, L., & Gattuso, J. P. (Edits.). (2010). Guide to best practices for ocean acidification research and data reporting. 260. Luxembourg: Publications Office of the European Union.
- Ries, J. B., Cohen, A. L., & McCorkle, D. C. (2009). Marine calcifiers exhibit mixed responses to CO₂-induced ocean acidification. *Geology*, 37 (12), 1131-1134.
- Robert- Baldo, G. L., Morris, M. J., & Byrne, R. H. (1985). Spectrophotometric determination of seawater pH using phenol red. *Analytical Chemistry*, 57 (13), 2564-2567.
- Schuster, U., Hannides, A., Mintrop, L., & Körtzinger, A. (2009). Sensors and instruments for oceanic dissolved carbon measurements. *Ocean Science*, 5, 547-558.
- Sigma-Aldrich Co. (1996). *Trizma Buffers: Product Specification*. Sigma-Aldrich Co.
- Templado, J., García, F. J., Pérez A., A., & Pérez, A. (2009). Grupo 1. Tipos de hábitat costeros y halofíticos. En VV.AA., *Bases ecológicas preliminares para la conservación de los tipos de hábitat de interés comunitario en España* (pág. 10). Madrid: Ministerio de Medio Ambiente, y Medio Rural y Marino.
- Yao, W., Liu, X., & Byrne, R. H. (2007). Impurities in indicators used for spectrophotometric seawater measurements: Assessment and remedies. *Marine Chemistry* (107), 167-172.

12. Anexos

12.1 Metodologías experimentales

Método 1 Comparación de celdas.

Materiales:

m-Cresol púrpura

Celda de flujo continuo

Celda fija

AMA1 con pH de 8.027 aproximado medido potenciométricamente.

Procedimiento:

Se tomaron muestras de agua de mar sintética en la celda fija y se le añadieron dos gotas de m-Cresol, se espero a que la temperatura de la muestra fuera de $25.0 \pm 0.1^{\circ}\text{C}$ y se tomaron 5 mediciones. Para las muestras con la celda de flujo continuo, la muestra se preparó en un matraz y se le añadió una cantidad de indicador proporcional al volumen de la muestra. Se colocó la manguera de la celda dentro del matraz y se hicieron 10 mediciones.

Método 2 Eficiencia del termostato

Materiales:

Agua de mar natural de Nayarit (AMN1)

Celda de vidrio

Cronómetro

Baño termostático

m-Cresol púrpura

Procedimiento:

Se pone el baño termostático a la temperatura ambiental deseada (10, 15, 20, 25, 30, 35, 40°C). La muestra de agua se deja en el baño de 10 a 15 minutos para que alcance el equilibrio térmico con el baño. Se toma una muestra del agua de mar y se mide el blanco 10 veces, después se devuelve esa agua al matraz que está dentro del baño termostático. Se esperan 3 minutos y se toma la muestra de agua que va a ser utilizada para la medición. Inmediatamente después de poner la muestra en la celda, se le agregan dos gotas de indicador, la celda se coloca en el compartimento del espectrofotómetro y se pone el termómetro. Se registra la primera medición de temperatura y a partir de ese momento se pone a correr el tiempo. Cada minuto se hace un registro de la temperatura y se hacen 5 mediciones de absorbancia hasta que la muestra registre una temperatura de $25.0 \pm 0.1^{\circ}\text{C}$.

Método 3 Comparación de lámparas

Materiales:

Agua desionizada con pH ajustados con potenciómetro de: 6.990, 7.550, 8.027, 8.502 y 8.990

m-Cresol púrpura

Celda fija de vidrio

Procedimiento:

De cada una de las muestras se midió el blanco, después se le añadió una gota de indicador y se esperó a que la temperatura se estabilizara en $25.0 \pm 0.1^\circ\text{C}$, una vez alcanzada esa temperatura se realizaron 5 lecturas. Ya que la muestra fue medida con ambas lámparas se desechó y se tomó una nueva muestra a la que se le añadió indicador para hacer la medición con una sola lámpara esto, con el fin de evitar que el indicador sufriera algún tipo de degradación que afectara los resultados de las mediciones.

Método 4 Comparación de volumen de indicador

Materiales:

AMA1 con pH medido potenciométricamente de: 6.990, 7.550, 8.027, 8.502 y 8.990.

m-Cresol púrpura

Celda de vidrio fija

Procedimiento:

El experimento se hizo en dos rondas, una con ambas lámparas encendidas y la otra con sólo la lámpara de luz visible. Se midieron los blancos y después se le añadió el m-Cresol a cada muestra, se esperó a que se estabilizara la temperatura en $25.0 \pm 0.1^\circ\text{C}$ y después se realizaron las mediciones. Cada pH se muestreó tres veces y a cada muestra se le añadió un volumen diferente de indicador (0.05, 0.1 y 0.15 ml), se decidió desechar las muestras una vez realizada la lectura y se utilizó una muestra nueva para cada volumen de indicador esto, para evitar cambios en el m-Cresol ocasionados por la exposición a la luz. Se realizaron 5 lecturas de cada una de las muestras.

Método 5 Degradación cada minuto

Materiales:

AMA2 con pH ajustados potenciométricamente de 7.017, 7.503, 8.157 (pH del AMA sin ajuste) y 8.505.

m-Cresol púrpura

Celda fija de vidrio

Procedimiento:

Se midió el blanco de cada muestra y se le añadieron dos gotas de m-Cresol, se esperó a que se estabilizara la temperatura en $25.0 \pm 0.1^{\circ}\text{C}$ y se hicieron cinco mediciones correspondientes al tiempo inicial, después en intervalos de 1 minuto se hicieron 5 lecturas, esto se hizo hasta completar 10 minutos, una vez completados los 10 minutos se desechó la muestra y se repitió el procedimiento con las muestras siguientes.

Método 6 Degradación cada 10 minutos

Materiales:

AMA2 con pH ajustados potenciométricamente de 7.457, 7.927, 8.212, 8.546 y 9.118

m-Cresol púrpura

Celda fija de vidrio

Procedimiento:

Se midió el blanco de cada muestra y se le añadió el m-Cresol, se esperó a que se estabilizara la temperatura en $25.0 \pm 0.1^{\circ}\text{C}$ y se hicieron cinco mediciones correspondientes al tiempo inicial, después en intervalos de 10 minutos se hicieron 5 lecturas más hasta completar una hora, después de transcurrido ése tiempo y realizadas las lecturas la muestra fue desechada. Esto se repitió con cada muestra.

Método 7 Degradación cada hora

Materiales:

AMA2 con pH ajustados potenciométricamente de 7.457, 7.927, 8.212, 8.546 y 9.118

m-Cresol púrpura

Celda fija de vidrio

Procedimiento:

Para los experimentos de degradación cada hora por 5 horas y degradación después de una semana de haber sido añadido el indicador. Para cada pH se separó un poco de agua de mar que se utilizó para los blancos y al agua restante, aproximadamente 80 mililitros, se le añadieron 18 gotas de m-Cresol equivalentes a 9 mililitros. Una vez homogeneizada la muestra con indicador se dividió en dos matraces uno de ellos fue utilizado en el experimento de degradación cada hora por 5 horas y el otro matraz fue guardado inmediatamente en un lugar fresco, seco y oscuro para ser utilizado posteriormente en el experimento de degradación después de una semana. Para las mediciones de pH se tomó una muestra del blanco y se midió, después se tomó muestra con indicador, se esperó a que se estabilizara la temperatura en $25.0 \pm 0.1^{\circ}\text{C}$ y se hicieron cinco lecturas de cada muestra para cada tiempo. Las muestras leídas se

regresaron a su matraz y volvieron a ser medidas una hora después. Este procedimiento se repitió cada hora por 5 horas.

Al término de este experimento las muestras que fueron utilizadas se almacenaron junto con las separadas previamente esto, con el fin de observar si habría algún tipo de diferencia entre las muestras guardadas inmediatamente después de añadido el indicador y las muestras que habían sido expuestas a la luz tras una semana de almacenamiento.

Método 8 Degradación después de una semana

Materiales:

AMA2 con pH ajustados potenciométricamente de 7.457, 7.927, 8.212, 8.546 y 9.118
m-Cresol púrpura
Celda fija de vidrio

Procedimiento:

Para los blancos se utilizó el agua sin indicador que había sido separada del experimento de degradación cada 5 horas y para las muestras se usaron las muestras que habían sido almacenadas previamente (sin exposición y con exposición previa a la luz). De cada una de esos matraces almacenados se tomó una muestra se esperó a que se estabilizara la temperatura en $25.0 \pm 0.1^\circ\text{C}$ y se realizaron 10 lecturas. Para comparar la degradación en el tiempo inicial y después de una semana se utilizaron las mediciones de tiempo inicial del experimento de degradación cada hora por 5 horas ya que son muestras que derivaron de la misma combinación de agua y indicador de las muestras almacenadas utilizadas en este experimento. También se realizaron medidas a las muestras que habían sido expuestas a la luz y almacenadas después de terminado el experimento de degradación cada hora por 5 horas.

Método 9 Contribución del indicador

Materiales:

Agua marina artificial AMA3.2 con salinidad de 34.429
m-Cresol púrpura 2
Micropipeta de $10\mu\text{L}$ a $100\mu\text{L}$
Celda de Vidrio de 3mL

Procedimiento:

Se tomó una muestra de alrededor de 100ml de AMA3.2 en un vaso de precipitados que fue envuelto con plástico envolvente, esto con el fin de que tuviera la mínima exposición con la atmósfera mientras se realizaban las mediciones. Además, el matraz que contenía el agua restante fue cerrado inmediatamente después de tomada la muestra de 100ml. Ésa muestra de 100ml es de la que se tomaron los lavados y las muestras para las lecturas. Se hizo una curva de adición de m-cresol con 10 puntos es decir, de $10\mu\text{L}$ a $100\mu\text{L}$, cada punto con una diferencia de $10\mu\text{L}$. Se tomó una muestra

del AMA3.2 con la celda de vidrio, ésta muestra fue utilizada para medir el blanco del espectrofotómetro y se le hicieron 5 lecturas de blanco sin m-cresol, posteriormente se le añadieron 100µL de m-cresol con la micropipeta, se esperó a que la temperatura se estabilizara en $25.0 \pm 0.1^{\circ}\text{C}$, una vez alcanzada la temperatura deseada se hicieron 5 mediciones y se desechó la muestra. Después de desechada la muestra se hicieron dos lavados de la celda con AMA3.2, después se tomó la muestra de AMA3.2 que iba a ser usada para las lecturas y se le añadieron 90 µL de m-cresol, se esperó a que alcanzara la temperatura deseada y se hicieron 5 lecturas. Éste procedimiento se repitió añadiendo 10 µL menos de m-cresol en cada ocasión hasta que se llegó a la adición de 10µL. Se añadió de mayor a menor volumen de m-cresol porque las instrucciones de la micropipeta recomiendan ir de mayores a menores volúmenes.

Método 10 Contribución del HgCl_2

Materiales:

Agua de mar artificial AMA3.2 con salinidad de 34.429
 HgCl_2 disolución saturada
m-Cresol púrpura 2
Micropipeta de 10µL a 100µL
Vasos de precipitados
Plástico envolvente
Probeta
Celda de Vidrio de 3mL
Guantes de latex

Procedimiento:

Se envolvieron los vasos de precipitados con plástico envolvente para que el agua no estuviera en contacto directo con la atmósfera. Una vez que se envolvieron los vasos de precipitados se tomaron 60 mililitros de agua con la probeta y se traspasaron al vaso previamente envuelto y fue cerrado con plástico envolvente inmediatamente. Todos los vasos de precipitados se llenaron consecutivamente, el plástico envolvente protegió a las muestras de llevar a cabo un intercambio gaseoso con la atmósfera mientras esperaban a ser utilizadas.

Cuando se comenzó el experimento se midió el blanco que fue aquél del agua sin HgCl_2 , una vez fijado el blanco del aparato, ése mismo blanco fue medido 5 veces sin m-cresol y 5 veces con dos gotas m-cresol. Para la preparación de las muestras con HgCl_2 se tomó alguno de los vasos de precipitados sellados y se abrió un poco, por esa abertura se introdujo la punta de la pipeta para añadir el volumen de HgCl_2 y por esa misma abertura se tomó muestra para los lavados y la muestra de la lectura. Se hizo una curva de adición de HgCl_2 con 10 puntos es decir, de 100µL a 10µL, los puntos con una diferencia de 10µL entre ellos. Es decir, en total se tuvieron 10 muestras con 10 diferentes volúmenes de HgCl_2 . Para cada muestra se hicieron dos lavados de la celda de vidrio con agua de la muestra siguiente, se tomó agua de la muestra para la lectura y se le añadieron 2 gotas de m-cresol, se esperó a que se estabilizara la temperatura en $25.0 \pm 0.1^{\circ}\text{C}$ para que se pudieran hacer las 5 lecturas de la muestra con m-cresol,

posteriormente la muestra fue desechada y la celda lavada con agua de la muestra siguiente. El procedimiento de desecho, lavado, adición de indicador y lecturas se repitió con todas las muestras de cada uno de los 10 volúmenes de HgCl_2 .

Método 11 Calibración con TRIS

Materiales:

Agua de mar artificial (AMA3) con pH ajustado con TRIS de 7, 7.5, 8, 8.3 y 8.5. las salinidades de cada una son: 36.9716 para las muestras de pH 7.5 y 7.7, 36.7499 para las muestras de pH 8 y 8.3, 35.8860 para la muestra de pH 8.5.

Celda de Vidrio

m-Cresol púrpura 2

Procedimiento:

Se tienen seis muestras diferentes de AMA3 es decir, una de blanco y las otras cinco tienen pH ajustados con TRIS de: 7.5, 7.7, 8, 8.3 y 8.5. Las mediciones realizadas para cada pH fueron: lectura del blanco, 5 lecturas de AMA3 como blanco, adición de 2 gotas de m-cresol a la muestra de agua de la celda, espera de la estabilización de la temperatura en $25.0 \pm 0.1^\circ\text{C}$ y 5 lecturas de cada muestra de pH con 2 gotas de m-cresol, después de leída la muestra con m-cresol, ésta fue desechada. Los blancos se midieron para cada pH es decir, cada uno tiene su blanco particular.

Método 12 Reproducibilidad

Materiales:

Agua de mar artificial (AMA3) con pH ajustado con TRIS de 8 y salinidad de 36.7499.

Celda de Vidrio

m-Cresol púrpura 2

HgCl_2 concentrado

Guantes de latex

Procedimiento:

Se tuvo la muestra de agua AMA3 con pH ajustado de 8, se tomaron 60ml de dicha muestra y se le agregaron 2 gotas de HgCl_2 , de ésta muestra de agua se hicieron 9 corridas de lecturas de absorbancia. Antes de comenzar las corridas se tomó la lectura del blanco del espectrofotómetro y 5 lecturas de blanco, después de haber leído el blanco se comenzaron las corridas para las que se tomó la celda con agua y se le añadieron 2 gotas de m-cresol, se volvió a colocar en el espectrofotómetro y se espero a que la temperatura se estabilizara en $25.0 \pm 0.1^\circ\text{C}$, se realizaron 5 lecturas de la muestra con m-cresol y se desechó la muestra. Para hacer la siguiente corrida, se hicieron dos lavados de la celda con agua de los 60ml de AMA3 pH8 con HgCl_2 y se tomó agua en la celda para hacer a lectura, se le agregaron 2 gotas de m-cresol, se esperó a que la temperatura se estabilizara y se hicieron 5 lecturas, después se

desechó la muestra, éste proceso se repitió 9 veces, se hicieron 9 corridas porque la muestra se 60ml de AMA3 pH8 con HgCl₂ se agotó.

Método 13 pH en el Estero de Urías, Mazatlán

Materiales:

Agua de mar natural del Estero de Urías con HgCl₂

m-Cresol púrpura 2

Micropipeta de 5 ml

Celda de Vidrio de 3mL

Guantes de latex

Procedimiento:

Se tuvieron 10 muestras de 60ml de agua marina natural más un replicado de 5 muestras para la estación 04 Baliza es decir, en total se tuvieron 14 frascos de muestras. A cada frasco se le añadieron 2 gotas (100µL) de HgCl₂ para su preservación. El procedimiento se detalla en la sección de protocolo de campo de AMN2. De cada frasco se tomó muestra con la micropipeta para realizar dos lavados a la celda, una vez realizados, se tomó la muestra que se usaría para las lecturas. El uso de la micropipeta es recomendable porque causa menos mezcla de agua dentro de la botella entonces, si se tiene suficiente cuidado se puede tomar muestra del fondo de la botella, ésta agua es la que menos contacto con la atmósfera ha tenido entonces, es por eso que es la preferida para el muestreo. Siempre que se tomó muestra ya fuera para los lavados o para la muestra que se iba a leer, se cerró inmediatamente el frasco de la muestra con el tapón de la misma para limitar su contacto con la atmósfera. Ya lavada y tomada la muestra para lectura, la celda se colocó en el espectrofotómetro y se esperó a que se estabilizara la temperatura en $25.0 \pm 0.1^{\circ}\text{C}$, una vez que se alcanzó ésa temperatura se midió el blanco del espectrofotómetro y se hicieron 5 lecturas de blanco, después de haber medido los blancos, se sacó la celda y se le añadieron dos gotas de m-cresol púrpura, se revolvió la muestra para homogeneizar el indicador agitándola y sosteniéndola con los dedos y asegurándose se tapar la celda para que no se derramara la muestra, después se colocó de nuevo en el espectrofotómetro, se insertó el termómetro y se esperó a que se estabilizara la temperatura en $25.0 \pm 0.1^{\circ}\text{C}$, se realizaron 5 lecturas de la muestra con indicador y se desechó la muestra. Para cada frasco se repitió todo el proceso de lavados, lectura de blanco del aparato, 5 lecturas del blanco, 5 lecturas de la muestra con indicador y desecho.

Método 14 Reproducibilidad del método

Materiales:

Agua de mar natural del Estero de Urías con HgCl₂ muestra 4c

m-Cresol púrpura 2

Micropipeta de 5 ml

Celda de Vidrio de 3mL

Guantes de latex

Procedimiento:

Se tuvo la muestra 4c de las muestras de agua AMN del Estero de Urías, de ésta muestra de agua se hicieron 7 corridas de lecturas de absorbancia. Antes de comenzar las corridas se tomó la lectura del blanco del espectrofotómetro y 5 lecturas de blanco, después de haber leído el blanco se comenzaron las corridas para las que se tomó la celda con agua y se le añadieron 2 gotas de m-cresol, se volvió a colocar en el espectrofotómetro y se espero a que la temperatura se estabilizara en $25.0 \pm 0.1^{\circ}\text{C}$, se realizaron 5 lecturas de la muestra con m-cresol y se desechó la muestra. Para hacer la siguiente corrida, se hicieron dos lavados de la celda con agua de la muestra 4c y se tomó agua en la celda para hacer a lectura, se le agregaron 2 gotas de m-cresol, se esperó a que la temperatura se estabilizara y se hicieron 5 lecturas, después se desechó la muestra, éste proceso se repitió 7 veces (7 corridas) porque la muestra 4c se agotó.

12.2 Tablas y figuras

Anexo Tabla 1 Comparación de las absorbancias en 434 y 578nm de las celdas de flujo y fija

pH	Celda fija		Celda de flujo	
	Abs<434nm>	Abs<578nm>	Abs<434nm>	Abs<578nm>
8.027	0.322	0.253	0.357	0.202
	0.321	0.252	0.353	0.200
	0.321	0.252	0.352	0.199
	0.320	0.251	0.350	0.198
	0.319	0.251	0.349	0.198
			0.351	0.199
			0.349	0.199
			0.350	0.199
			0.348	0.198
			0.351	0.199
Promedio	0.321	0.252	0.351	0.199
Desv est	0.001	0.001	0.003	0.001
CV	0.3	0.3	0.7	0.6

Anexo Tabla 2 Comparación de los valores de absorbancia en 434nm y 578nm utilizando sólo la lámpara de luz visible (tungsteno) y ambas lámparas (tungsteno y UV {deuterio}) con una sola gota de indicador. **Notación: longitud de onda-número de lámparas-número de gotas.

pH	Absorbancia (longitud de onda- número de lámparas- número de gotas)			
	434-1-1	434-2-1	578-1-1	578-2-1
6.9900	0.370	0.4241	0.256	0.2693
	0.370	0.4241	0.257	0.2693
	0.370	0.4238	0.257	0.2689
	0.369	0.4239	0.256	0.2690
	0.369	0.4237	0.255	0.2689
Promedio	0.370	0.4239	0.256	0.2691
Desv est	0.001	0.0002	0.001	0.0002
CV	0.1594	0.0361	0.2198	0.0669
7.5500	0.354	0.3481	0.270	0.2497
	0.352	0.3483	0.269	0.2498
	0.353	0.3483	0.270	0.2503
	0.355	0.3483	0.270	0.2501
	0.355	0.3485	0.269	0.2502
Promedio	0.354	0.3483	0.270	0.2500
Desv est	0.001	0.0002	0.001	0.0003
CV	0.3276	0.0452	0.1931	0.1022

	0.329	0.296	0.253	0.246
	0.321	0.297	0.252	0.247
8.0270	0.321	0.298	0.252	0.247
	0.320	0.298	0.251	0.247
	0.320	0.298	0.251	0.247
Promedio	0.321	0.297	0.252	0.247
Desv est	0.001	0.001	0.001	0.001
CV	0.3009	0.2571	0.3451	0.2446
	0.2372	0.1827	0.5850	0.4891
	0.2369	0.1826	0.5849	0.4889
8.5020	0.2371	0.1826	0.5851	0.4884
	0.2372	0.1828	0.5852	0.4885
	0.2370	0.1827	0.5850	0.4882
Promedio	0.2371	0.1827	0.5850	0.4886
Desv est	0.0001	0.0001	0.0001	0.0004
CV	0.0473	0.0486	0.0157	0.0770
	0.1606	0.1267	0.8367	0.7224
	0.1605	0.1269	0.8367	0.7230
8.9900	0.1603	0.1272	0.8365	0.7235
	0.1604	0.1267	0.8366	0.7233
	0.1605	0.1266	0.8367	0.7237
Promedio	0.1604	0.1268	0.8366	0.7232
Desv est	0.0001	0.0002	0.0001	0.0005
CV	0.0756	0.1829	0.0123	0.0687

Anexo Tabla 3 Lámpara de tungsteno (visible): comparación de promedio, desviaciones estándar y coeficientes de variación de absorbancias a 434nm y 578nm con 1, 2 y 3 gotas

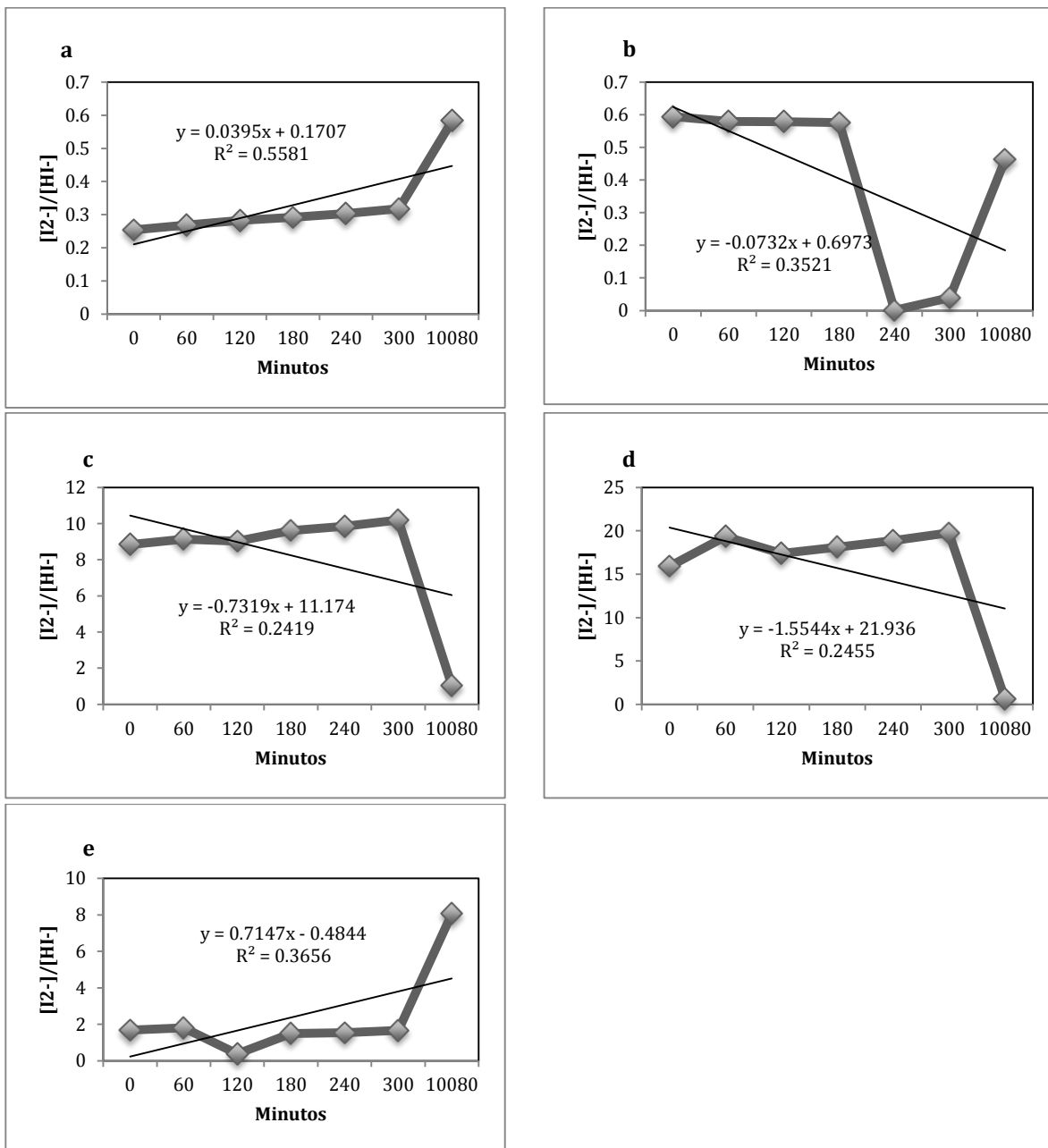
pH	1 gota						2 gotas						3 gotas					
	434nm			578nm			434nm			578nm			434nm			578nm		
	Prom	Desv Est	CV	Prom	Desv Est	CV	Prom	Desv Est	CV	Prom	Desv Est	CV	Prom	Desv Est	CV	Prom	Desv Est	CV
6.99	0.370	0.001	0.1594	0.256	0.001	0.2198	0.8234	0.0003	0.0404	0.5466	0.0001	0.0207	1.114	0.001	0.0874	0.7392	0.0002	0.0285
7.55	0.354	0.001	0.3276	0.270	0.001	0.1931	0.690	0.001	0.0936	0.499	0.001	0.1648	0.855	0.002	0.2356	0.629	0.001	0.2249
8.027	0.320	0.001	0.3009	0.252	0.001	0.3451	0.5562	0.0003	0.0546	0.4300	0.0002	0.0390	1.010	0.001	0.0533	0.7522	0.0004	0.0486
8.502	0.2371	0.0001	0.0473	0.5850	0.0001	0.0157	0.39	0.01	1.7890	0.929	0.01	0.7806	0.6285	0.0004	0.0702	1.371	0.001	0.0481
8.99	0.1604	0.0001	0.0756	0.8366	0.0001	0.0123	0.3559	0.0003	0.0909	1.806	0.001	0.0585	0.4060	0.0003	0.0857	2.003	0.002	0.1002

Anexo Tabla 4 Lámparas UV/Vis: comparación de promedio, desviaciones estándar y coeficientes de variación de absorbancias a 434nm y 578nm con 1, 2 y 3 gotas

pH	1 gota						2 gotas						3 gotas					
	434nm			578nm			434nm			578nm			434nm			578nm		
	Prom	Desv Est	CV	Prom	Desv Est	CV	Prom	Desv Est	CV	Prom	Desv Est	CV	Prom	Desv Est	CV	Prom	Desv Est	CV
6.9900	0.4239	0.0002	0.0361	0.2691	0.0002	0.0669	0.7205	0.0001	0.0153	0.5057	0.0001	0.0237	1.134	0.001	0.0567	0.9379	0.0002	0.0263
7.5500	0.3483	0.0002	0.0452	0.2500	0.0003	0.1022	0.6566	0.0005	0.0725	0.4684	0.0004	0.0802	1.0756	0.0002	0.0186	0.7827	0.0003	0.0370
8.0270	0.297	0.001	0.2571	0.247	0.001	0.2446	0.7341	0.0003	0.0370	0.5636	0.0004	0.0640	1.0962	0.0005	0.0435	0.8604	0.0004	0.0467
8.5020	0.1827	0.0001	0.0486	0.4886	0.0004	0.0770	0.47	0.01	1.2053	1.13	0.01	0.6778	0.7910	0.0003	0.0375	1.759	0.001	0.0452
8.9900	0.1268	0.0002	0.1829	0.7232	0.0005	0.0687	0.2492	0.001	0.2181	1.4022	0.0003	0.0205	0.521	0.001	0.1264	2.474	0.003	0.1202

Anexo Tabla 5 Comparación de medidas de $[I^{2-}]/[HI^-]$ obtenidas con las muestras almacenadas una semana con exposición y sin exposición a la luz

Tiempo	7.4570	7.9270	8.2120	8.5460	9.1180
1 sem	0.5833	0.4635	1.0382	0.6339	8.0602
1 sem c/luz	0.1687	0.5059	0.7809	0.5501	6.7160



Anexo Figura 1 Comparación de valores de $[I^{2-}]/[HI^-]$ obtenidos en los experimentos de degradación cada hora, por 5 horas y después de 1 semana de adición del indicador. a) 7.457, b) 7.927, c) 8.212, d) 8.546 y e) 9.118

12.3 Manual de uso del Espectrofotómetro Agilent8453 para la medición de pH oceánico

12.3.1 Equipo

12.3.1.1. Computadora

La computadora debe de tener instalado el software ya que, de no tenerlo, no será posible controlar ni obtener datos del espectrofotómetro. BAJO NINGUNA CIRCUNSTANCIA DEBE DE CONECTARSE A INTERNET NI SERLE DESCARGADAS ACTUALIZACIONES DE WINDOWS, esto podría causar interferencias en la comunicación del equipo y sería necesaria la ayuda de un técnico para resolver el problema lo cual, causaría demoras en las mediciones de pH.

12.3.1.2. Espectrofotómetro Agilent 8453 y peltier

El peltier debe estar conectado directamente al espectrofotómetro y éste a su vez debe estar conectado a la computadora y a un enchufe de energía eléctrica.

12.3.2 Encendido

- Encender la computadora y esperar a que esté iniciada completamente, una vez que la computadora está lista para usarse se prende solamente el espectrofotómetro y se espera a que se inicie.
- Prender el espectrofotómetro y esperar a que el foco LED que tiene al frente cambie de color amarillo a verde. Ya que se haya puesto el foco verde, entonces es posible prender el peltier.
- Prender el peltier.
- Acceder al programa controlador del espectrofotómetro en modo Online.

Es importante que se sigan los pasos rigurosamente ya que de no hacerlo así, puede que haya fallas en la comunicación del equipo y deba de reiniciarse todo el proceso, apagando todo y encendiéndolo de nuevo. Es posible que algunas veces a pesar de haberse seguido el método como está indicado, haya alguna falla de comunicación, si esto ocurre, debe de apagarse todo y reiniciar el proceso.

Antes de poder hacer mediciones se deben esperar 30 minutos para que las lámparas “se calienten” y estabilicen para que ya no presenten variaciones en la intensidad de la luz.

12.3.3 Software

El software tiene dos modos: Online y Offline. El método Online es utilizado cuando se está usando el espectrofotómetro es decir, cuando el equipo está comunicándose con la computadora. El método Offline se utiliza cuando se quiere acceder a los datos del espectrofotómetro sin necesidad de tener prendido el equipo. Ambos modos funcionan de manera igual, la diferencia radica en que cuando se utiliza el método Online, se pueden realizar mediciones y consulta de datos mientras que en método Offline solo se puede hacer consulta de datos.

Desde el software se puede controlar la cantidad de lámparas que se van a utilizar (UV/Vis) , se puede indicar el tipo de celda (fija o de flujo), la dirección del flujo, la temperatura del peltier, activación el agitador, hacer la lectura de blanco, la lectura de muestras, indicar las longitudes de onda de las que se quiere obtener la absorbancia, se pueden nombrar las muestras, se pueden guardar los espectros y los datos de absorbancia y también se puede acceder a resultados de experimentos anteriores. Cuando se deba determinar el método de nombramiento que se va a utilizar es recomendable que se escoja el que permite la realización todas las lecturas y después el nombramiento de las mismas ya que de otro modo no pueden realizarse las siguientes lecturas a menos de que se nombren tras cada medición, ésta opción hace el proceso de lectura de las muestras más lento.

Para guardar los resultados de las lecturas se debe ir a la parte superior central de la pantalla en donde se encuentra un botón con un dibujo de un espectro y un disquete, se oprime ese botón y aparecerá una pantalla que nos permite nombrar el experimento y guardarlo en una carpeta. Cuando se guarda la información, se guardan las gráficas, los datos de absorbancia de las longitudes de onda fijadas y los datos de absorbancia de todo el espectro entonces, si se quiere consultar información de otra longitud de onda después, es posible hacerlo. Los archivos que se guarden estarán localizados en la siguiente dirección: Computadora-> Programs(C:)-> Chem32 ->1 -> Data. En la carpeta de DATA se pueden hacer carpetas correspondientes a los experimentos que se estén realizando esto, con el fin de que estén más ordenados. Si se han creado carpetas particulares para cada experimento lo único que hace falta para guardar los archivos directamente en ellas es que se indique la carpeta en la ventana que sale cuando se oprime el botón de la longitud de onda y el disquete.

12.3.4 Lecturas de muestras

Para realizar las lecturas es necesario contar con el siguiente material:

- Celda de vidrio
- Agua desionizada
- Acetona
- Papel absorbente
- Papel seda
- m-Cresol púrpura (2mM pH 8.0± 0.1)
- Vaso de desecho

- Guantes de látex (por precaución cuando se utiliza HgCl₂)
- Bata
- Bitácora

12.3.4.1. Preparación de celdas

Antes de utilizar la celda fija, ésta debe ser enjuagada con acetona para quitar cualquier rastro de grasa del vidrio y debe de limpiarse con el papel seda para evitar que se raye. Una vez que se ha limpiado con acetona se enjuaga dos veces con agua desionizada y está lista para ser utilizada. Si se utilizan guantes de látex, se recomienda lavarse las manos con los guantes puestos para que así se elimine el polvo de la superficie de los guantes y no ensucien la celda posteriormente.

12.3.4.2. Muestras

La muestra se pone en la celda dejando un espacio de alrededor de 0.5cm para que el agua no se caiga al momento de introducir el termómetro ni al añadir el indicador.

12.3.4.3. Blanco

Cuando se tiene una nueva muestra de agua, se le debe medir el blanco. Esto se hace poniendo la muestra sin indicador en el espectrofotómetro y oprimiendo el botón de Blank, una vez que se ha medido el blanco, en la pantalla de la computadora aparecerá un espectro en una ventana pop-up, ésta ventana puede minimizarse para evitar que estorbe. Cuando se oprime el botón de Blank, el espectrofotómetro está fijando el blanco de la muestra pero no nos brinda ningún tipo de datos que nosotros podamos utilizar en los cálculos de pH, debido a esto es que se deben realizar 5 lecturas de éste blanco antes de añadirle indicador a la muestra.

12.3.4.4. Lectura de muestras

Para realizar las lecturas de las muestras se debe presionar el botón de Sample. Cuando se está realizando la lectura se escucha un movimiento mecánico dentro del espectrofotómetro, en la pantalla en la parte inferior derecha se lee la leyenda “busy” (ocupado) y el foco LED cambia de color a amarillo, cuando se ha terminado la lectura, el sonido interno cesa, la leyenda cambia de “busy” a “ready” (listo) y el foco LED cambia de color a verde. Cada lectura dura al rededor de 6 segundos.

Una vez que se han realizado las lecturas de los blancos entonces ya es posible añadir 2 gotas de indicador de m-Cresol a la celda, revolverla, ponerla de nuevo en el espectrofotómetro y taparla con el termómetro. Es necesario que se espere a que la temperatura se estabilice en $25.0 \pm 0.1^{\circ}\text{C}$, en cuanto se ha estabilizado, es posible realizar las lecturas.

12.3.4.5. Cambio de muestra

Después de que se han realizado las lecturas de una muestra, para cambiar de muestra se debe de enjuagar la celda con dos lavados de la muestra que va a ser utilizada para las siguientes lecturas, se rellena con el tercer volumen de muestra y se le añaden 2 gotas de m-Cresol, se revuelve, se pone en el espectrofotómetro, se tapa con el termómetro y se espera la estabilización de la temperatura para realizar las lecturas. Éste proceso debe repetirse siempre que se cambie de muestra dentro de un mismo lote (por ejemplo diferentes tomas de muestra de una misma botella).

Cuando se cambia de lote es decir, se cambia de botella o sitio de colecta se debe realizar de nuevo las lecturas de blanco del espectrofotómetro y las 5 lecturas de blanco antes de poder realizar las lecturas de las muestras con indicador. De no hacerse, se tendrán errores en los blancos pues el espectrofotómetro estará usando el blanco de otra muestra que no corresponde con las de la muestra que se está utilizando en ese momento.

12.3.4.6. Resultados

Cuando se realizan las lecturas en la pantalla aparece el espectro de la medición y los datos de absorbancia correspondientes a las longitudes de onda (434, 578 y 730nm) que fueron indicadas con anterioridad en el software. Al lado de los valores de absorbancia para cada longitud de onda se encuentra un espacio en blanco en donde se puede nombrar la lectura, es recomendable que se nombren las muestras una vez terminada una serie de lecturas para que así se eviten errores de nombramiento y diferenciación de las muestras. Siempre que se termine un experimento se deben de guardar los resultados como se indica en la sección de Software.

Para poder extraer los resultados del programa se pueden seleccionar y copiar para ser pegados en un programa que soporte documentos con extensión .txt por ejemplo, NotePad. Los datos simplemente deben ser pegados y guardados en un documento .txt. Para poder utilizarlos en otra computadora deben de ser trasladados por medio de un USB ya que la computadora conectada al espectrofotómetro no tiene Internet.

12.3.5 Obtención de los valores de pH

12.3.5.1. Cálculo del valor de pH medido

El cálculo del valor de pH de la muestra a partir de las lecturas de absorbancia requiere de los siguientes valores: absorbancia del blanco y las muestras con indicador para las longitudes de onda de 434, 578 y 730nm. También se necesita la temperatura en que la muestra fue leída ($25.0 \pm 0.1^\circ\text{C}$) y la salinidad.

Ya que se tienen esos valores entonces se deben ingresar a la fórmula:

$$pH = \frac{1245.69}{(T/K)} + 3.8275 + 2.11 \times 10^{-3}(35 - S) + \log \left(\frac{A_1/A_2 - 0.0069}{2.222 - (A_1/A_2 \cdot 0.1331)} \right)$$

Donde T= temperatura de la muestra al momento de ser leída y S= salinidad de la muestra. En donde A_1/A_2 se obtiene de los valores de absorbancia corregida de fondo correspondientes a 578nm y 434nm.

$$A_1/A_2 = \frac{(578nm^{**} - 578nm^*) - (730nm^{**} - 730nm^*)}{(434nm^{**} - 434nm^*) - (730nm^{**} - 730nm^*)}$$

** valores de absorbancia obtenidos después de haber sido añadido el m-Cresol y * valores de absorbancia de los blancos para la longitud de onda indicada

12.3.5.2. Calibración con TRIS

A los valores obtenidos de las lecturas realizadas con el espectrofotómetro se les suman 0.09 ± 0.05 unidades de pH para obtener el valor de pH calibrado.