



UNIVERSIDADE DA CORUÑA

## Grado en Química

Memoria del Trabajo de Fin de Grado

# **ESTUDIO DE LA EVOLUCIÓN DE LOS COMPUESTOS NITROGENADOS DE UN SISTEMA BIOLÓGICO CON APORTE DE CO<sub>2</sub>**

*Título en gallego: Estudo da evolución dos compostos nitroxenados dun sistema biolóxico co aporte de CO<sub>2</sub>.*

*Título en inglés: Study of the evolution of nitrogen compounds from a biological system with CO<sub>2</sub> contribution.*

**Lara Fernández Puga**

Julio, 2014



UNIVERSIDADE DA CORUÑA

El trabajo titulado **ESTUDIO DE LA EVOLUCIÓN DE LOS COMPUESTOS NITROGENADOS DE UN SISTEMA BIOLÓGICO CON APORTE DE CO<sub>2</sub>** que constituye la Memoria del Trabajo de Fin de Grado de la alumna **LARA FERNÁNDEZ PUGA**, ha sido realizado en la Facultad de Ciencias de la Universidade de A Coruña, bajo la tutorización académica de los profesores Dr. Fernando Avecilla Porto y la Dra. Alatzne Carlosena Zubieta.

A Coruña, 19 de Julio de 2014

Dr. Fernando Avecilla Porto

Dra. Alatzne Carlosena Zubieta

*Título en gallego: Estudo da evolución dos compostos nitroxenados dun sistema biolóxico co aporte de CO<sub>2</sub>.*

*Título en inglés: Study of the evolution of nitrogen compounds from a biological system with CO<sub>2</sub> contribution.*

## *Agradecimientos*

A los profesores Alatzne Carlosena Zubieta y Fernando Avecilla Porto por su apoyo, supervisión y orientación, así como por su disponibilidad y paciencia para resolver dudas.

A la profesora Isabel Turnes Carou por la realización de los análisis por electroforesis capilar para la determinación de amonio en las muestras de agua.

A Maribel por su acogida y ayuda a la hora de ubicarme en el laboratorio.

A mis compañeros de promoción por los buenos momentos vividos durante estos cuatro años de aventura.

A mis padres y resto de familia por haber confiado en mí y estar siempre a mi lado apoyándome.

Muchas gracias a todos ellos.

## Abreviaturas

Adenosín Monofosfato	AMP
Adenosín Difosfato	ADP
Adenosín Trifosfato	ATP
Flavín Adenín Dinucleótido	FAD
Fosfato inorgánico	Pi
Nicotinamina Adenina Dinucleótido Fosfato (forma reducida)	NaDPH
Nicotinamina Adenina Dinucleótido Fosfato (forma oxidada)	NaDP
Pirofosfato inorgánico	PPi

# *Índice*

1.- Resumen.....	1
2.- Introducción.....	4
2.1.-Conexiones entre la química y la biología.....	4
2.2.-Utilización del nitrógeno inorgánico: ciclo del nitrógeno .....	5
2.2.1.-Fijación biológica del nitrógeno .....	7
2.2.2.- Utilización de nitrato .....	9
2.2.3.-Utilización del amoníaco: biogénesis del nitrato orgánico .....	9
2.3.-Importancia del CO <sub>2</sub> en el ciclo del nitrógeno.....	12
3.- Descripción del sistema.....	15
4.- Objetivo.....	18
5.- Parte experimental.....	20
5.1.- Equipos, material y reactivos .....	20
5.2.- Estrategia de análisis.....	21
5.3.- Determinación de iones nitrato.....	23
5.3.1.-Determinación directa.....	23
5.3.2.-Determinación del método de la derivada.....	27
5.4.- Determinación de iones nitrito.....	29
5.5.- Determinación de iones amonio.....	33
5.6.- Determinación de la dureza del agua.....	33
5.7.-Determinación de la alcalinidad .....	34
5.8.-Determinación del pH .....	36
5.9.-Determinación de la conductividad .....	37
5.10.-Determinación del contenido de N en plantas .....	38
6.- Resultados y discusiones.....	
7.-Conclusión.....	



## 1.- Resumen

El presente estudio tiene como objeto evaluar la evolución de los compuestos nitrogenados de un sistema biológico variando la cantidad de CO<sub>2</sub> aportada al mismo. El sistema considerado es un acuario plantado de agua dulce (80 L).

El trabajo experimental se centra en la realización de una serie de ensayos aportando al sistema cantidades variables de compuestos nitrogenados y de otros nutrientes inorgánicos (KNO<sub>3</sub>, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>), en presencia de distintas concentraciones de CO<sub>2</sub> disuelto, de acuerdo con una estrategia previamente establecida. A continuación se lleva a cabo la determinación de los principales parámetros analíticos que permiten evaluar las condiciones del agua de un acuario: nitratos, nitritos, amonio, pH, conductividad, dureza y alcalinidad. Se complementa el estudio con la determinación del contenido de nitrógeno y carbono total así como carbono orgánico total en la biomasa vegetal producida en el acuario.

De los resultados obtenidos se pudo establecer que el sistema se comporta de forma diferente en función de los niveles aportados de CO<sub>2</sub>:

- Cuando la cantidad de CO<sub>2</sub> aportada es baja, el sistema obtuvo una parte del nitrógeno de los nitratos añadidos al agua en forma de KNO<sub>3</sub> y otra parte del amonio que se produce de forma natural en el sistema.
- Al incrementar el aporte de CO<sub>2</sub> aumentó significativamente el consumo de nitratos a partir del KNO<sub>3</sub> añadido.
- Al estudiar la biomasa generada en el sistema se obtuvo un notable aumento de la masa total cuando se incrementó el aporte de CO<sub>2</sub>, así como del nitrógeno absorbido.

Esto nos lleva a concluir que el sistema ha incrementado su actividad biológica como consecuencia del aumento en el aporte de CO<sub>2</sub>.

## Summary

The present study aims to assess the evolution of the nitrogen compounds of a biological system by varying the amount of CO<sub>2</sub> provided. The system is an Aquarium of fresh water (80 L) contains a suit of plants.

Experimental procedure focuses on conducting several trials where the system is fed with variable amounts of nitrogen compounds and other inorganic nutrients (KNO<sub>3</sub>, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>), while different levels of CO<sub>2</sub> are applied, in accordance with a previously established strategy. The determination of the principal analytical parameters to evaluate the water characteristics of the aquarium is then accomplished: nitrates, nitrites, ammonia, pH, conductivity, hardness and alkalinity. The study is complemented with the determination of the content of nitrogen, total carbon and total organic carbon in the plant biomass grown in the Aquarium.

From the results, it can be established that the system behaves differently depending on the levels of CO<sub>2</sub>:

- When the amount of CO<sub>2</sub> is low, the system obtains part of the nitrogen consumed from the nitrates added to the water in the form of KNO<sub>3</sub>.
- when the contribution of CO<sub>2</sub> increases, the consumption of nitrates enhanced significantly from the KNO<sub>3</sub> added.
- When the biomass generated in the system was studied, a significant increase in the total mass was registered when the contribution of CO<sub>2</sub> was high, as well as the absorbed nitrogen.

This leads to the conclusion that the system has increased its biological activity because of the increase in the contribution of CO<sub>2</sub>.



## Resumo

O presente traballo ten como obxectivo avaliar a evolución dos compostos nitroxenados dun sistema biolóxico variando a cantidade de CO<sub>2</sub> achegada ao mesmo. O sistema considerado é un acuario plantado de auga doce (80 L).

O traballo experimental céntrase na realización dunha serie de ensaios aportando ao sistema cantidades variables de compostos nitroxenados e doutros nutrientes inorgánicos (KNO<sub>3</sub>, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>), en presenza de distintas concentracións de CO<sub>2</sub> disolto, dacordo cunha estratexia previamente establecida. A continuación lévase a cabo a determinación dos principais parámetros analíticos que permiten avaliar as condicións da auga dun acuario: nitratos, nitritos, amonio, pH, conductividade, dureza e alcalinidade. Complementábase o estudo coa determinación do contido de nitróxeno e carbono total e mais o carbono orgánico total na biomasa vexetal producida no acuario.

Dos resultados obtidos púidose establecer que o sistema se compórta de forma diferente en función dos niveis achegados de CO<sub>2</sub>:

- Cando a cantidade de CO<sub>2</sub> aportada é baixa, o sistema obtivo unha parte do nitróxeno dos nitratos engadidos á auga en forma de KNO<sub>3</sub> e outra parte do amonio que se produce de forma natural no sistema.
- Ao incrementar a achega de CO<sub>2</sub> aumentou significativamente o consumo de nitratos a partir do KNO<sub>3</sub> engadido.
- Ao estudar a biomasa xerada no sistema obtívose un notable aumento da masa total cando se incrementou a achega de CO<sub>2</sub>, así como o nitróxeno absorbido.

Isto lévanos a concluir que o sistema incrementou a súa actividade biolóxica como consecuencia do aumento na achega de CO<sub>2</sub>.

## 2.- Introducción

### 2.1.- Conexiones entre la Química y la Biología

La Química Bioinorgánica y la Química Bioorgánica son ramas interdisciplinarias de la Química que se ocupan de una amplia gama de problemas ubicados en la frontera entre la Química, la Bioquímica y la Biología. Todas ellas se interrelacionan entre sí, como se postula en la teoría de Gaia<sup>1</sup>, modelo científico de la biosfera en el cual se establece que la vida fomenta y mantiene unas condiciones adecuadas para sí misma, afectando al entorno mediante un proceso de autorregulación.

Estas ciencias ubicadas entre la Química y la Biología estudian el empleo de los elementos químicos, que se conocen como esenciales, porque forman parte de las estructuras biológicas que permiten el desarrollo de la vida.

En la actualidad, se han llegado a reconocer como esenciales para los organismos unas tres docenas de elementos, 27 de los cuales ya han sido aceptados universalmente como tales. Tal y como puede verse en la Tabla 1. Además de C, H, N y O, constituyentes básicos de los compuestos orgánicos, todos los demás son elementos típicamente inorgánicos. Estos elementos se pueden dividir en tres grupos.

**Tabla 1.** Clasificación de los elementos

Grupo	Elementos
Constituyentes mayoritarios	H, C, N, O
	Na, K, Mg, Ca
	P, S, Cl
Elementos traza	Fe, Cu, Zn, Si, F, Br
Elementos ultratrazas	V, Cr, Mo, Mn, Co, Ni, B, As, Se, I

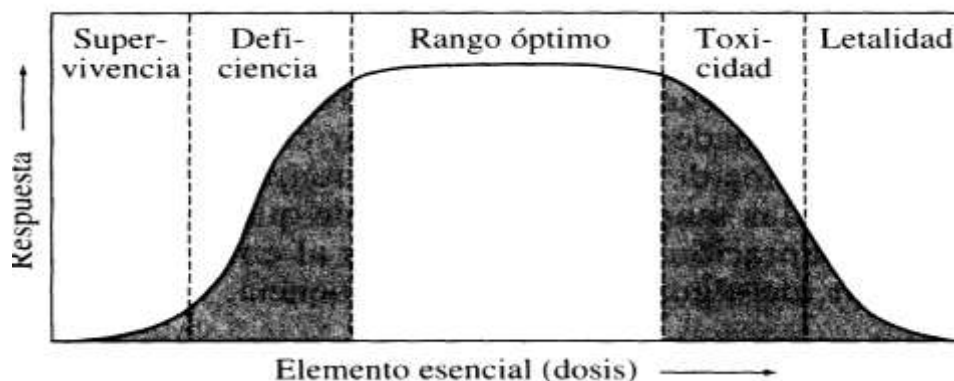
Los organismos pasan por diferentes etapas en función de que la cantidad disponible de un elemento esencial pase de deficiente a excesiva. Una absorción deficitaria puede llevar a la muerte pero una incorporación limitada permite la supervivencia. Cuando la dosis es la adecuada lleva a la meseta del diagrama de Bertrand, <sup>[2]</sup> que representa el intervalo

<sup>1</sup> T. M. Lenton. *Nature* **1998**, 394, 439-447.

<sup>[2]</sup> M<sup>a</sup> Vallet, J. Faus, E. García-España, J. Moratal. *Introducción a la Química Bioinorgánica*. Ed. Síntesis, Madrid, **2003**.

óptimo de concentración. Si la dosis es excesiva se produce la toxicidad que puede llevar a la muerte (Figura 1).

El funcionamiento normal de un organismo vivo requiere un balance cuidadoso y un equilibrio delicado entre todos los diferentes elementos que necesita para realizar sus funciones vitales.



**Figura 1.** Diagrama de Bertrand. Curva dosis-respuesta de un elemento esencial.

Un aminoácido es, como su propio nombre indica, un compuesto que contiene a la vez un grupo amino y un grupo ácido. Un péptido es un oligómero de aminoácidos, es decir, cadenas más o menos grandes de aminoácidos unidos entre sí por uniones peptídicas. Las proteínas son polímeros de aminoácidos unidos entre sí por uniones peptídicas. Todas las proteínas conservan un grupo amino que no ha reaccionado en un extremo, llamado amino terminal o *N-terminal*, y un carboxilo en el otro extremo conocido como carboxilo terminal o *C-terminal*. Algunas de estas proteínas catalizan diversas reacciones químicas en los procesos vitales y se conocen como enzimas. Se conocen unos 2000 y se nombran habitualmente agregando el sufijo -asa al nombre del sustrato, o sea, al del compuesto sobre el cual actúa la enzima. Aparte de estos tipos de compuestos, los sistemas biológicos han generado otra serie de ligandos, muy particulares, capaces de captar a los centros metálicos a los que complejan. Estos ligandos son, esencialmente, macrociclos tetrapirrólicos, que actúan como agentes quelatantes tetradentados. Se forman por sustitución de las posiciones 1 a 8 de un ligando básico de carácter macrocíclico llamado porfina. Sistemas basados en este tipo de macrociclos se estudian para conseguir modelizar las funciones biológicas de forma artificial, como la fotosíntesis <sup>[3]</sup> en la que intervienen las clorofilas que son derivados de las porfinas.

<sup>[3]</sup> S. Fukuzumi, K. Ohkubo and T. Suenobu, *Acc. Chem. Res.* **2014**, 47, 1455-1464.

Por tanto, la mayoría de sistemas biológicos contienen proteínas con grupos funcionales que incorporan nitrógeno, o ligandos derivados de la porfina que también necesita nitrógeno para biosintetizarse.

## 2.2.- Utilización del nitrógeno inorgánico: ciclo del nitrógeno

El ciclo del nitrógeno al igual que los demás ciclos biogeoquímicos, tiene una trayectoria definida, dado que tiene que seguir una serie de procesos físicos, químicos y biológicos. El nitrógeno se encuentra en varias formas, y se llevan a cabo en él una serie de procesos químicos en los que el nitrógeno es tomado del aire y es modificado para finalmente ser devuelto a la atmósfera. <sup>[4]</sup>

Para muchos organismos el crecimiento y la reproducción están limitados por la biodisponibilidad del nitrógeno utilizable,<sup>[5]</sup> que a su vez está limitada por la capacidad de los organismos para utilizar diferentes formas inorgánicas del nitrógeno. Todos los organismos pueden convertir el amoníaco ( $\text{NH}_3$ ) en compuestos de nitrógeno orgánicos, es decir, sustancias que contienen enlaces C-N. Sin embargo no todos los organismos pueden sintetizar amoníaco a partir de las formas más abundantes de nitrógeno como son el nitrógeno gas ( $\text{N}_2$ ) y el ión nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ). Las enzimas y los factores que controlan estos procesos son objeto de controversia hoy en día. <sup>[6]</sup>

La reducción del  $\text{N}_2$  a  $\text{NH}_3$  denominada fijación biológica del nitrógeno y la reducción del  $\text{NO}_3^-$  a  $\text{NH}_3$  son las etapas con las que se inicia la conversión del nitrógeno inorgánico en orgánico (Figura 2).

El ciclo del nitrógeno tiene seis etapas de las cuales sólo la etapa de asimilación no es realizada por bacterias:

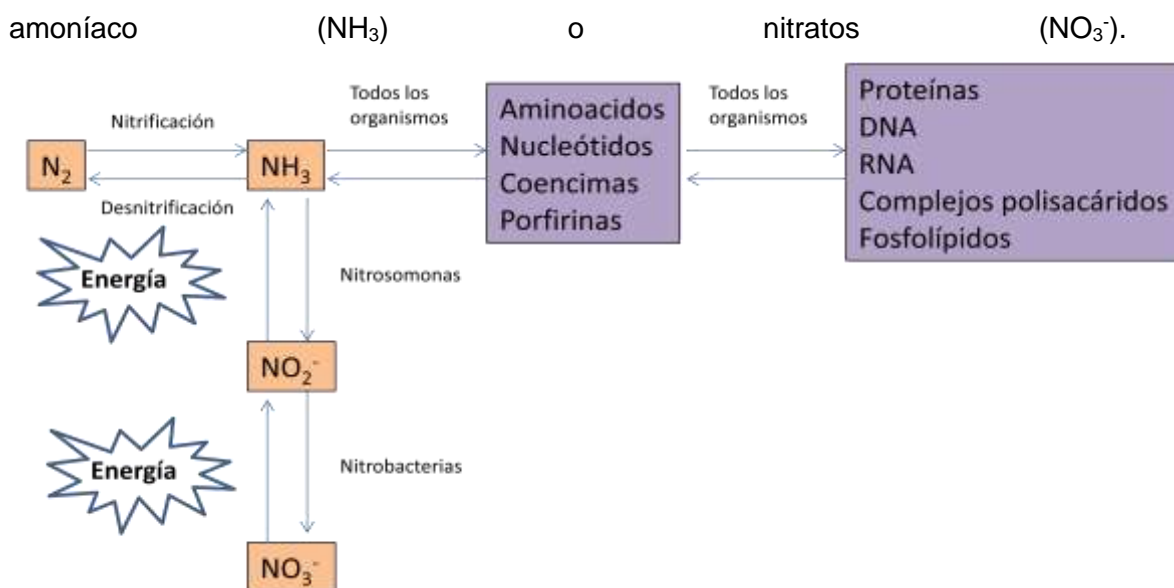
1. Fijación: la fijación biológica del nitrógeno consiste en la incorporación del nitrógeno atmosférico a las plantas, gracias a algunos microorganismos, principalmente bacterias y cianobacterias que se encuentran presentes en el suelo y ambientes acuáticos. Posteriormente se produce la conversión de nitrógeno gaseoso ( $\text{N}_2$ ) en

---

<sup>[4]</sup> W. Weisany, Y. Raei and K.H. Allahverdipoor, *Bull. Env. Pharmacol. Life. Sci.*, **2013**, 2, 77-84.

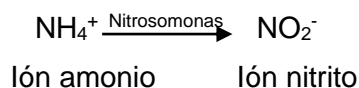
<sup>[5]</sup> B. L. Turner, S. J. Write: *Biogeochem*, **2014**, 117, 115-130.

<sup>[6]</sup> F. Horchani, R. Hajri, S. Aschi-Smiti, *J. Plant Nutr. Soil Sci.* **2010**, 173, 610-617.

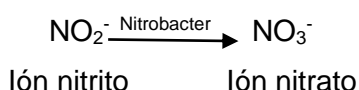


**Figura 2.** Relaciones entre el metabolismo del nitrógeno inorgánico y orgánico. <sup>[7]</sup>

2. Nitrificación: es la oxidación del ión amonio y la producción de nitrato por medio de la nitrificación.<sup>[8]</sup> Esta fase es realizada en dos pasos por diferentes bacterias, primero las bacterias del suelo Nitrosomonas y Nitrococcus convierten el amonio en nitrito:



En la segunda etapa otras bacterias del suelo Nitrobacterias oxidan el nitrito en nitrato:

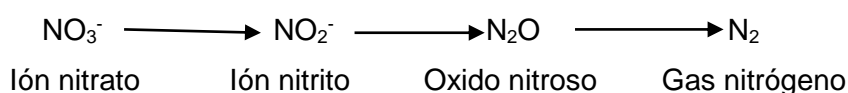


Las plantas terrestres tienden a utilizar el nitrato como fuente de nitrógeno para sintetizar sus proteínas porque el nitrato es muy móvil en el suelo y llega a las raíces con más facilidad que el amonio. Los iones amonio constituyen una fuente de nitrógeno más eficiente porque requieren menos energía para ser incorporados en las proteínas. En el caso de las plantas acuáticas ocurre lo contrario, prefieren fijar amonio a nitratos.

<sup>[7]</sup> C. K. Mathews, K. E. van Holde, K. G. Ahern. *Bioquímica*. Ed. Pearson Educación, S.A., Madrid, **2002**.

<sup>[8]</sup> C. A. Francis, J. M. Beman and M. M. Kuypers, *The ISME Journal*, **2007**,1,19-27

3. Asimilación: La asimilación ocurre cuando las plantas absorben a través de las raíces nitrato o amoníaco, elementos formados por la fijación del nitrógeno o la nitrificación. Luego estas moléculas son incorporadas tanto a las proteínas como a los ácidos nucleicos de las plantas.
4. Amonificación: cuando los organismos producen desechos que contienen nitrógeno como la orina (urea), los excrementos de las aves (ácido úrico) así como los organismos muertos, éstos son descompuestos por bacterias presentes en el suelo y en el agua liberando el nitrógeno al medio, bajo la forma de amonio ( $\text{NH}_4^+$ ). En este nuevo proceso de integración de nitrógeno al ciclo, las bacterias llevan a cabo la digestión enzimática, y el amonio se degrada a compuestos aminados que son finalmente convertidos en aminoácidos.
5. Inmovilización: es el proceso contrario a la mineralización, por medio del cual las formas inorgánicas ( $\text{NH}_4^+$  y  $\text{NO}_3^-$ ) son convertidas a nitrógeno orgánico y, por tanto, no asimilables.
6. Desnitrificación: es la reducción bioquímica del ión nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) presente en el suelo o en el agua a óxido nitroso ( $\text{N}_2\text{O}$ ) o gas nitrógeno ( $\text{N}_2$ ) pudiendo así el nitrógeno regresar a la atmósfera.<sup>[9]</sup> Es llevada a cabo por bacterias desnitrificantes, como las *Pseudomonas Fluorescens*. Este proceso es parte de un metabolismo degradativo en la que el nitrato toma un papel de aceptor de electrones. La desnitrificación se puede representar de la siguiente manera y es llevada a cabo en condiciones anaerobias:



En los siguientes apartados se va a proceder al desarrollo de algunas de las etapas del ciclo.

<sup>[9]</sup> G. J. Tortora, B. R. Funke, C. L. Case. *Introducción a la Microbiología*. Ed. Panamericana, Buenos Aires, 2007.

### 2.2.1.-Fijación biológica del nitrógeno

Entre las especies más destacadas que fijan nitrógeno se encuentran ciertas bacterias de vida libre (p. ej., *Azotobacter vinelandii*), las cianobacterias (p. ej., *Anabaena azollae*) y bacterias simbióticas (p. ej., cuantiosas especies de *Rhizobium*).<sup>[10]</sup>

Las enzimas que intervienen en la fijación del nitrógeno son extremadamente sensibles al oxígeno y sólo pueden estudiarse en condiciones anaerobias. El principal motivo por el que puede fijarse nitrógeno en los nódulos de las plantas que contienen bacterias del género *Rhizobium*, es que los nódulos contienen una proteína abundante, denominada **leghemoglobina**, que mantiene un medio anaerobio al fijar todo el O<sub>2</sub> que llega al nódulo.

El sistema enzimático responsable de la reducción del nitrógeno, denominado complejo nitrogenasa, está formado por dos proteínas distintas. Una proteína denominada componente I, que es una proteína que contiene molibdeno-hierro, la cual cataliza la reducción del nitrógeno, y la otra denominada componente II, proteína de hierro, la cual transfiere los electrones al componente I.<sup>[11]</sup>

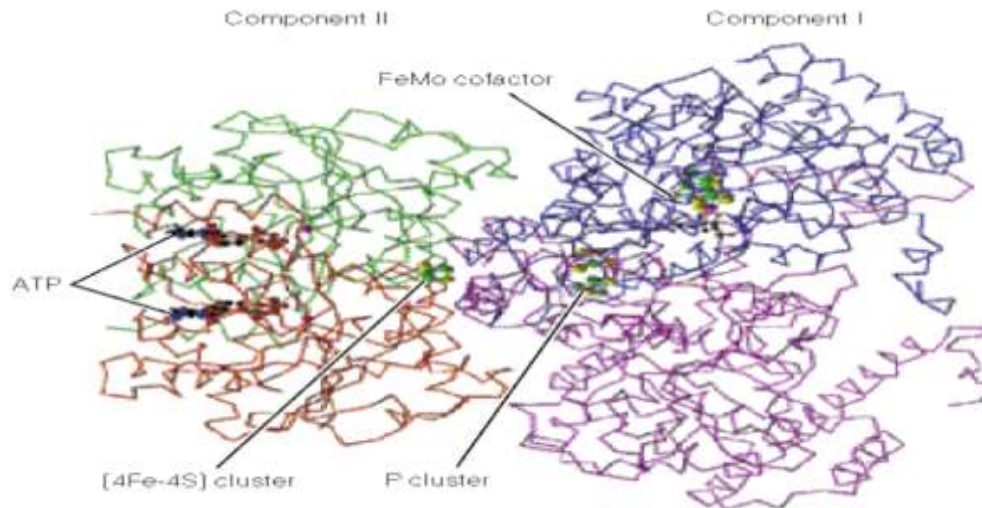
Como se muestra en la Figura 3 el componente II contiene un grupo Fe<sub>4</sub>S<sub>4</sub> convencional, mientras que el componente I contiene dos complejos hierro-azufre nuevos: el grupo P que contiene 7 azufres y 8 hierros y el cofactor hierro-molibdeno, el cual, como se muestra, contiene 9 azufres, 7 hierros y un ion molibdeno ligado también a la molécula de homocitrato.<sup>[12]</sup> Los electrones fluyen desde la ferredoxina (en *Rhizobium*) o la flavodoxina (en *Klebsiella*) al complejo Fe<sub>4</sub>S<sub>4</sub> del componente II y la hidrólisis del ATP unido dirige, de alguna manera, los electrones al grupo P del componente I y luego al cofactor hierro-molibdeno. Estos tres grupos están lo suficientemente juntos en el complejo para permitir una transferencia fácil de los electrones. Casi con certeza, la reducción del N<sub>2</sub> se produce en la coenzima unida, pero para entenderlo mejor deberíamos describir el modo de unión del nitrógeno y no es el objeto de este trabajo.

---

<sup>[10]</sup> T. Mckee, J.R. McKee. *Bioquímica, las bases moleculares de la vida*. Ed. Mc Graw Hill, México D.F., **2009**.

<sup>[11]</sup> B. K. Burgess, D.J. Lowe. *Chem. Rev.* **1996**, 96,2983-3011.

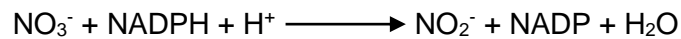
<sup>[12]</sup> K. Rupnik, C.C. Lee, J. A. Wiing, Y. Hu, M. W. Ribbe, B.J. Hales. *Biochemistry* **2014**, 1108-1116.



**Figura 3.** Muestra el componente II y el componente I de la nitrógenasa. <sup>[9]</sup>

### 2.2.2.-Utilización de nitrato

La reducción del nitrato a nitrito es difícil químicamente y se realiza gracias a la intervención de una enzima grande y compleja, la nitrato reductasa. Esta enzima contiene FAD, molibdeno y un citocromo 557 (que contiene una ferredoxina  $\text{Fe}_4\text{S}_4$ ). La enzima lleva a cabo la reacción global:



Los electrones se transfieren al FAD unido a la enzima, luego al citocromo 557, luego al molibdeno y finalmente al sustrato. El molibdeno está unido a un cofactor que contiene un anillo de pteridina, que es bastante distinto de la estructura del cofactor hierro-molibdeno.

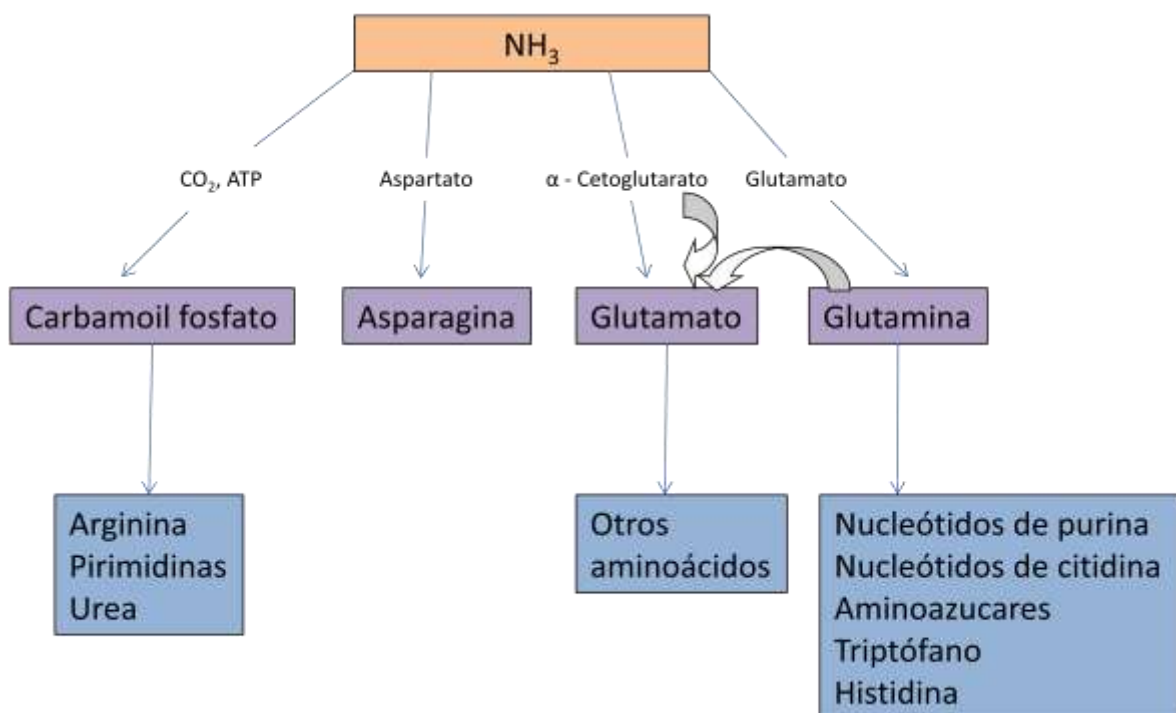
La reducción del nitrito a amoníaco se lleva a cabo en tres pasos ( $\text{NO}_2^- \rightarrow \text{NO}^- \rightarrow \text{NH}_2\text{OH} \rightarrow \text{NH}_3$ ) mediante una enzima, la nitrito reductasa. Esta enzima contiene una ferredoxina  $\text{Fe}_2\text{S}_2$  y una molécula de sirohemo, una porfirina parcialmente reducida. El transportador electrónico para cada uno de los pasos es la ferredoxina.



### 2.2.3.-Utilización del amoníaco: biogénesis del nitrato orgánico

El amoníaco a concentraciones elevadas es muy tóxico, pero a concentraciones más bajas constituye un metabolito central, que actúa como sustrato de cuatro enzimas que lo convierten en diversos compuestos orgánicos nitrogenados. A pH fisiológico la especie iónica dominante es el ión amonio,  $\text{NH}_4^+$ . En las cuatro reacciones principales, catalizadas por estas enzimas, interviene el par de electrones no compartidos del  $\text{NH}_3$  que es, por tanto, la especie reactiva.

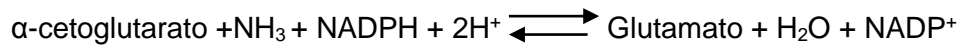
Todos los organismos asimilan amoníaco a través de reacciones que conducen al glutamato, la glutamina, la asparagina y el carbamoil fosfato (Figura 4). Dado que el carbamoil fosfato solo se utiliza en la biosíntesis de la arginina, la urea y los nucleótidos de pirimidina, la mayor parte del nitrógeno va a parar a la biosíntesis de aminoácidos y otros compuestos nitrogenados, que transcurre a través de los dos aminoácidos glutamato y glutamina.



**Figura 4.** Reacciones de asimilación del amoníaco y principales destinos del nitrógeno fijado.

a) *Glutamato deshidrogenasa: aminación reductora del α-cetoglutarato*

La glutamato deshidrogenasa cataliza la aminación reductora del α-cetoglutarato:



La reacción es reversible. La mayor parte de las bacterias y muchas plantas contienen una forma de la enzima específica para el NADPH, que actúa fundamentalmente en la dirección de la formación del glutamato. Las bacterias que crecen con el amoníaco como única fuente de nitrógeno utilizan esta reacción como ruta principal de asimilación de nitrógeno.

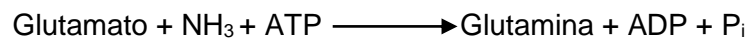
Una enzima relacionada, la glutamato sintasa, cataliza una reacción comparable a la catalizada por la glutamato deshidrogenasa pero que actúa fundamentalmente en la biosíntesis de glutamato:



La glutamato sintasa desempeña un papel de mayor importancia en la síntesis del glutamato en la mayor parte de las células.

*b) Glutamina sintetasa: generación de nitrógeno amida biológicamente activo*

Tanto si se forma por la acción de la glutamato deshidrogenasa o la glutamato sintasa, el glutamato puede aceptar un segundo grupo amoníaco para formar glutamina en la reacción catalizada por la glutamina sintetasa. Se requiere  $\text{Mn}^{2+}$ .



La reacción de la glutamina sintetasa se produce a través del ataque del ion amonio a un intermediario acil fosfato. El ATP fosforila al carbono  $\delta$  del glutamato para dar un anhídrico de ácido carboxílico-fosfórico, que sufre un ataque nucleófilo por el nitrógeno del amoníaco para dar un aminoácido, la glutamina.

*c) Asparagina sintetasa: una reacción semejante de aminación*

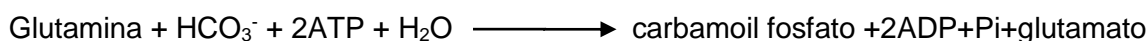
Una enzima comparable a la glutamina sintetasa, la asparagina sintetasa, tiene también una amplia distribución, aunque su contribución a la asimilación del amoníaco es mucho menor. La asparagina sintetasa utiliza amoníaco o glutamina para catalizar la conversión de aspartato a asparagina. <sup>[9]</sup>



Obsérvese que la asparagina sintetasa rompe el ATP para dar AMP y  $\text{PP}_i$ , mientras que la glutamina sintetasa da ADP y  $\text{P}_i$ .

d) *Carbamoil fosfato sintetasa: generación de un intermediario para la síntesis de arginina y pirimidina.*

La enzima responsable es la carbamoil fosfato sintetasa. Tanto el amoníaco como la glutamina pueden actuar como donadores de nitrógeno.



La enzima puede catalizar ambas reacciones aunque el sustrato preferido es la glutamina.

### 2.3.- Importancia del CO<sub>2</sub> en el ciclo del nitrógeno

El ciclo del nitrógeno no es independiente de los otros ciclos biogeoquímicos. La influencia que el incremento del CO<sub>2</sub> tiene en los diversos sistemas biológicos es un tema de radiante actualidad. El CO<sub>2</sub> influye también en las poblaciones microbianas y en la actividad enzimática así como en el incremento de las emisiones de CH<sub>4</sub> y N<sub>2</sub>O en diversos tipos de plantaciones. <sup>[13]</sup>

En el presente trabajo se estudia la influencia en el consumo de nitrato y amonio en función del aporte de CO<sub>2</sub> regulado por medio del pH. Para mantener el pH constante se utiliza un sistema amortiguador que es una mezcla de dos componentes químicos, uno capaz de reaccionar con hidrogeniones cuando estos se hallan en exceso, y el otro capaz de liberarlos cuando se hallan en concentración baja. En nuestro caso el amortiguador es el sistema bicarbonato/ácido carbónico, este sistema presenta dos características que lo habilitan para ser un buen sistema amortiguador: <sup>[14]</sup>

1. El ácido carbónico se forma por la hidratación del dióxido de carbono a través de la reacción  $\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{H}_2\text{CO}_3$  que tiene una constante de equilibrio muy baja ( $1,7 \times 10^{-3}$ ), lo cual significa que en el equilibrio, en su gran mayoría, las moléculas se encuentran como CO<sub>2</sub> y no como H<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>.

<sup>[13]</sup> P. Bhattacharyya, K. S. Roy, S. Neogy, P. K. Dash, A. K. Nayak, S. Mohanty, M. J. Baig, R. K. Sarkar, K. S. Rao, *Sci. Total Environ.*, **2013**, 461-462, 601-611.

<sup>[14]</sup> A. Mendoza. *Ciencia Ergo Sum*, **2008**, 15(2), 155-160.

2. El amortiguador de bicarbonato/ácido carbónico/dióxido de carbono permite explicar cómo es que, a pesar del valor de pK tan bajo, regula eficazmente el pH lo que consiste en su capacidad para modular la concentración de bicarbonato y CO<sub>2</sub>. Hay que recordar que el pH depende de la relación  $[\text{HCO}_3^-]/[\text{CO}_2]$  que viene recogida en la ecuación de Henderson-Hasselback.

Por lo tanto si disminuimos el pH lo que estaremos haciendo será aumentar la concentración de CO<sub>2</sub> disuelto mientras que si aumentamos el pH estaremos disminuyendo la concentración de CO<sub>2</sub>. Un aumento o disminución de la cantidad de CO<sub>2</sub> puede provocar un aumento o disminución en la velocidad de la fotosíntesis, debido a que la fotosíntesis lleva a cabo la reducción y posterior asimilación de dióxido de carbono, así como de ciertas formas inorgánicas de nitrógeno (dinitrógeno, nitrato y nitrito) y azufre, tres de los bioelementos esenciales para la síntesis de las macromoléculas biológicas (proteínas, lípidos, porfirinas, ácidos nucleicos).

El proceso global de la fotosíntesis se divide en reacciones luminosas y reacciones oscuras. Las reacciones luminosas, que requieren luz visible como fuente de energía, para producir NADPH y ATP, liberando O<sub>2</sub> en el proceso. El NADPH y el ATP impulsan las denominadas reacciones oscuras, que se producen tanto en presencia de luz como en ausencia de ella y fijan CO<sub>2</sub> en los hidratos de carbono.

En el caso de las reacciones luminosas, los organismos fotosintéticos han desarrollado un conjunto de pigmentos que absorben de manera eficaz la luz visible e infrarroja próxima. Las partes de estos pigmentos que absorben luz se denominan cromóforos, compuestos que absorben luz de una longitud de onda específica. En la Figura 5 se representan las estructuras de algunos de los cromóforos más importantes. En la Figura 6 se comparan los espectros de absorción de algunos pigmentos fotosintéticos con la distribución de la radiación solar en el espectro.

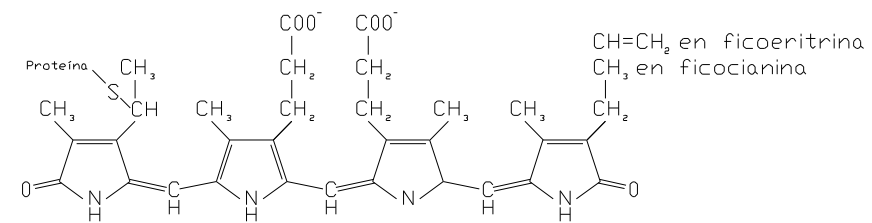
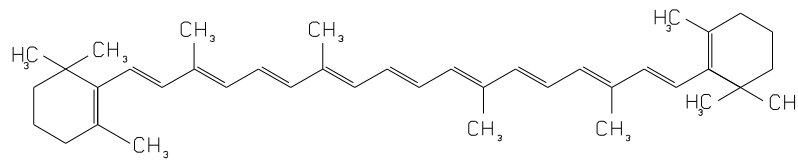
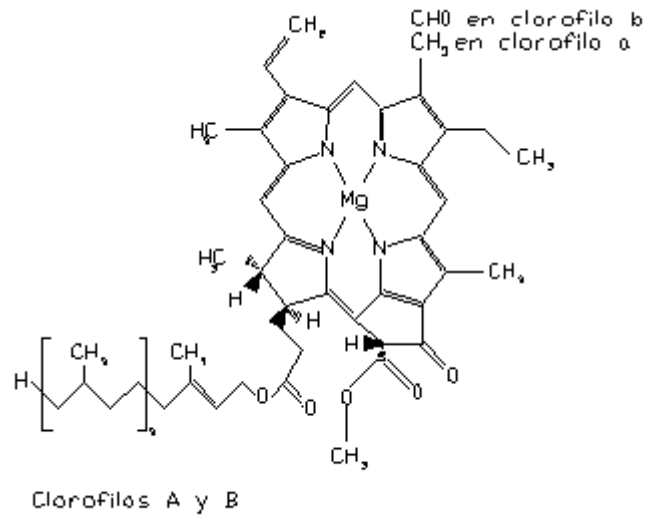
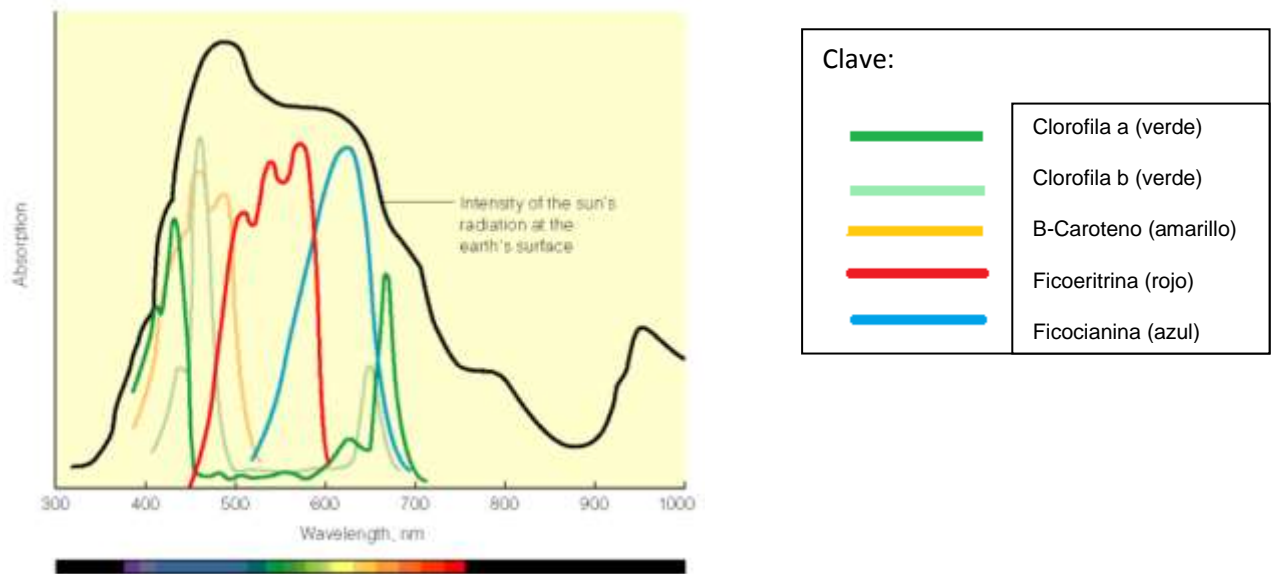


Figura 5. Estructura de algunos pigmentos fotosintéticos presentes en las plantas.



**Figura 6.** Espectros de absorción de varios pigmentos de plantas con la distribución espectral de la luz solar que llega a la tierra. <sup>[9]</sup>

### 3.- Descripción del Sistema de Estudio

El sistema en estudio es un acuario plantado de 80 litros que contiene las siguientes especies de plantas: *Alternanthera cardinalis*, *Cryptocoryne wendtii tropica*, *Cryptocoryne wendtii red*, *Microsorium pteropus*, *Lilaeopsis novae-zelandiae*, *Limnophila sessiliflora-ambulia*, *Rotala indica* y *Rotala rotundifolia*.



**Figura 7.-** Plantas del sistema biológico en estudio.

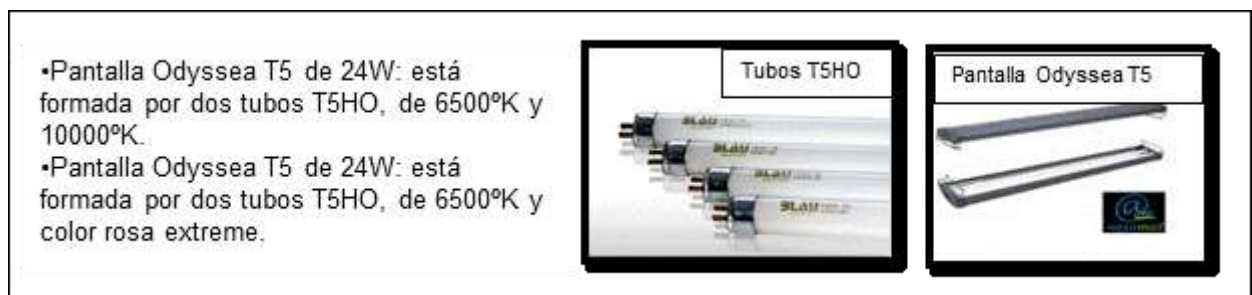


Aparte de esta gran variedad de plantas en el acuario habitan diferentes especies de peces: siete *Xiphophorus Maculatus* (platys), cinco *Paracheirodon Axeroldi* (tetra cardenal), dos *Betta Splendes* (Luchador de Siam) y dos *Crossochelius Siamensis* (zorro volador de Siam). El acuario dispone de un sistema de alimentación digital a pilas EHEIM que es el encargado de proporcionarles el alimento a los peces de forma regular y automática.



**Figura 8.** Peces del sistema biológico en estudio.

Las plantas acuáticas necesitan ciertos elementos para llevar a cabo la fotosíntesis y sintetizar los aminoácidos necesarios para la biosíntesis de proteínas. Dos factores importantes son la luz y los nutrientes. Para ello el acuario dispone de un sistema de iluminación formado por una tira de leds 55 cm (5 W) y dos pantallas Odyssey T5HO para agua dulce con dos tubos cada una de 24 W. Además de la iluminación cuenta también con un sistema de aporte de CO<sub>2</sub> que inyecta directamente el CO<sub>2</sub> en el agua. Los componentes que forman parte del acuario se describen en las Figuras 9 y 10, respectivamente.



**Figura 9.** Componentes del sistema de iluminación del acuario.





**Figura 10.** Componentes del sistema de aporte de CO<sub>2</sub> del acuario.

Para controlar los parámetros del agua y mantenerlos en niveles adecuados <sup>[2]</sup> y no tóxicos, el acuario cuenta con un filtro interior y otro exterior (Tabla 2) que permiten mantener el agua en condiciones adecuadas tanto para las plantas como para que los peces puedan llevar a cabo su proceso vital. Para que la temperatura del agua se mantenga en torno a 27°C posee un sistema de calefacción formado por un termocalentador EHEIM thermo control de 100 W.

**Tabla 2.** Descripción de los filtros interior y exterior del acuario

Filtro exterior EHEIM Classic 2211	Filtro interior EHEIM pickup 45
Caudal 300 L/h con un consumo de 5W Volumen material filtrante: 1,3 L Medio filtrante biológico EHEIM substract pro Canutillos cerámicos Esponjas filtrantes EHEIM classic 2616111	Cartuchos de filtración EHEIM pickup 45. Eliminador de fosfato EHEIM phosphate out. Sistema de llaves para cerrar y limpiar el filtro.

Semanalmente el acuario se rellena con 4-5 L de agua y 10 mL Nutrafin Plant Gro, para reponer el agua que se evapora y la que se extrae para realizar los diferentes análisis en este estudio. El sistema cuenta con una bomba para acuario EHEIM compact 300, tubo y grifo para realizar la toma de muestras.

El sustrato está compuesto por arena de sílice de 5 mm de grosor y arena volcánica de una media de 10 mm de grosor que constituye el 70% de la mezcla. Además se ha

incorporado en la mezcla tierra vegetal y akadama en proporción 20:10 con respecto al total. También introducimos una piedra de tipo caliza para aumentar la dureza del agua.

En la Figura 11 se muestra una foto del sistema estudiado en el presente trabajo.



**Figura 11.** Sistema biológico en estudio (acuario plantado agua dulce, 80 L)

## 4.- Objetivo

El presente estudio tiene como objeto evaluar la evolución de los compuestos nitrogenados de un sistema biológico variando la cantidad de CO<sub>2</sub> aportada al mismo. El sistema considerado es un acuario plantado de agua dulce (80 L). Para ello se llevan a cabo diversos ensayos aportando al sistema cantidades variables de compuestos nitrogenados y de otros nutrientes inorgánicos (KNO<sub>3</sub>, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>), en presencia de distintas concentraciones de CO<sub>2</sub> disuelto.

Desde el punto de vista analítico, se aplicarán los métodos y técnicas instrumentales adecuados para la determinación de diferentes especies de nitrógeno en el agua del sistema (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, NO<sub>2</sub><sup>-</sup>, NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) así como de otros parámetros analíticos que permiten caracterizar dichas muestras: alcalinidad, pH, dureza y conductividad. De manera complementaria, se intentará comprobar si las condiciones ensayadas influyen en el contenido en nitrógeno (N) que han absorbido las plantas que se desarrollan dentro del acuario.

Finalmente, se tratará de relacionar los resultados obtenidos con la actividad biológica del sistema y establecer cómo evoluciona el ciclo del nitrógeno en este sistema concreto.

## 5.- Parte Experimental

El trabajo experimental de esta memoria se centra en la realización de una serie de ensayos aportando al sistema cantidades variables de compuestos nitrogenados y de otros nutrientes inorgánicos ( $\text{KNO}_3$ ,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ), en presencia de distintas concentraciones de  $\text{CO}_2$  disuelto, de acuerdo con una estrategia previamente establecida. A continuación se llevó cabo la determinación de los principales parámetros analíticos que permiten evaluar las condiciones del agua de un acuario: nitratos, nitritos, amonio, pH, conductividad, dureza y alcalinidad. Se complementa el estudio con la determinación del contenido de nitrógeno y carbono total así como carbono orgánico total en la biomasa vegetal producida en el acuario.

A continuación se describe la estrategia diseñada, los ensayos realizados y los procedimientos empleados.

### 5.1.- Equipos, material y reactivos

Los aparatos empleados para este trabajo se relacionan a continuación:

- Balanza electrónica AND modelo ER-180A, de precisión  $\pm 0,0001$  g.
- Balanza granataria Precisa modelo 620C, precisión  $\pm 0.01$ g.
- Conductímetro Crison modelo GLP 32.
- Espectrofotómetro UV-Vis VWR, modelo UV-6300PC.
- Estufa Selecta P  $\leq 250^\circ\text{C}$ .
- Liofilizador LABCONCO LYPH-LOCK 6.
- Molino de discos oscilantes Fritsch, modelo Pulverisette 9.
- pH metro Crison modelo Basic 20.

Las características del material de laboratorio empleado son las siguientes:

- El material volumétrico (matraces, vasos, pipetas, etc.) es de vidrio.
- Micropipeta Eppendorf, de 100-1000  $\mu\text{L}$  de capacidad.
- Celdas de cuarzo planoc cuadradas de 1 cm de lado.

Todo este material se lava con agua y jabón, se enjuaga con agua ultrapura tres veces.

Los reactivos utilizados para llevar a cabo las experiencias son:

- Ácido clorhídrico 36% PA, Panreac.
- Ácido etilendiaminotetrácetico PA, Panreac.

- Ácido fosfórico 85% PA, Panreac.
- Ácido oxálico 2-hidrato PA, Panreac.
- Ácido sulfúrico 98% PA, Panreac.
- Amoníaco 30% PA, Panreac.
- Cloruro de amonio PR, Probus.
- Cloroformo PA, Panreac.
- Dihidrógenofosfato potásico PA, Panreac
- Indicadores químicos: Fenolftaleína (0,5% en EtOH), Naranja de metilo (0,1% en H<sub>2</sub>O) y Negro de Eriocromo T (0,5% p/p en NaCl).
- N-1naftiletildiamina diclorohidrato PA, Panreac.
- Nitrato potásico PA, Merck.
- Nitrito sódico PA, Merck.
- Permanganato potásico PA, Panreac.
- Sulfanilamida PA, Sigma.

Para la preparación de todas las disoluciones se utiliza agua ultrapura 18 MΩ .cm de resistividad específica obtenida con un sistema Milli-Q (Millipore).

## 5.2.- Estrategia de Análisis

El sistema objeto de estudio presenta unas condiciones iniciales descritas en la Tabla 3. El pH está regulado mediante el controlador de pH que lo mantiene dentro de un intervalo ( $\pm 0,05$ ) con una válvula solenoide que regula el aporte de CO<sub>2</sub>. De tal forma que un aumento o descenso del flujo de este gas se traducirá en una variación del pH registrado por el dispositivo.

**Tabla 3.** Condiciones iniciales del sistema bajo estudio.

<i>pH</i>	7,40 $\pm$ 0,05
<i>Conductividad</i>	451 $\pm$ 6 $\mu$ S/cm
<i>Alcalinidad</i>	171,5 $\pm$ 5,6 mg CaCO <sub>3</sub> /L
<i>Dureza</i>	159,0 $\pm$ 6,4 mg CaCO <sub>3</sub> /L

Se establece una sistemática, que se describe en la Tabla 4, para evaluar la evolución de los compuestos nitrogenados después de incorporar al sistema nutrientes inorgánicos (KNO<sub>3</sub>, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>), con distintos niveles de CO<sub>2</sub> aportados.

La programación se realiza por semana. La adición de nutrientes se hace de forma gradual para no alterar el sistema de forma brusca y nunca se supera un valor de 10 mg NO<sub>3</sub><sup>-</sup>/L. Esta concentración es inferior a la establecida en el RD 1541/1994, de 8 de julio, que regula los criterios de calidad de las aguas superficiales y fija el contenido máximo de nitratos en 50 mg/L.

Finalizada la incorporación de todo el nutriente, se diseña un muestreo del agua del acuario. El muestreo se realiza cada dos horas, tomando un volumen de 150 mL a través de un sistema de extracción de muestras compuesto por una bomba de acuario EIHEM compact 300, tubo y grifo. Se emplean botes de polietileno que se llenan al máximo, minimizando el volumen de aire en el interior. En el caso de la biomasa vegetal, se muestrea al finalizar el periodo de estudio.

**Tabla 4.** Sistemática de trabajo establecida.

<b>Nivel bajo de CO<sub>2</sub></b>	
<i>pH fijado</i>	7,40 ± 0,05
<i>Periodo de estudio</i>	17 al 21 marzo 2014
<i>Aporte nutrientes</i>	300 mg KNO <sub>3</sub> 3 días consecutivos (1 <sup>o</sup> , 2 <sup>o</sup> y 3 <sup>er</sup> día)
<i>Toma de muestra</i>	<i>Agua del acuario:</i> Muestreo inicial (sin aporte, 1 <sup>er</sup> día) Muestreo después del último aporte: durante 3 días se recogen 3 muestras diarias cada 2 h (3 <sup>o</sup> , 4 <sup>o</sup> y 5 <sup>o</sup> día) <i>Biomasa vegetal:</i> <sup>(*)</sup> Toma de muestra de las plantas del acuario (poda, 5 <sup>o</sup> día).
<i>Aporte H<sub>2</sub>O</i>	Se adicionan 4 L de H <sub>2</sub> O al acuario (5 <sup>o</sup> día)
<b>Nivel intermedio y alto de CO<sub>2</sub><sup>(**)</sup></b>	
<i>pH fijado</i>	7,35 ± 0,05 (1 <sup>o</sup> , 2 <sup>o</sup> y 3 <sup>er</sup> día) 7,20 ± 0,05 (4 <sup>o</sup> día)
<i>Periodo de estudio</i>	31 marzo al 4 abril 2014
<i>Aporte nutrientes</i>	300 mg KNO <sub>3</sub> , 2 días consecutivos (1 <sup>er</sup> y 2 <sup>o</sup> día) 50 mg de KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 1 vez (2 <sup>o</sup> día)
<i>Toma de muestra</i>	<i>Agua del acuario:</i> Muestreo inicial (sin aporte, 1 <sup>er</sup> día) Muestreo después del último aporte: durante 3 días se recogen 3 muestras diarias cada 2 h (2 <sup>o</sup> , 3 <sup>o</sup> y 4 <sup>o</sup> día) <i>Biomasa vegetal:</i>

	Toma de muestra de las plantas del acuario (poda, 5 <sup>o</sup> día).
<i>Aporte H<sub>2</sub>O</i>	Se adicionan 4 L de H <sub>2</sub> O al acuario (5 <sup>o</sup> día)
<b>Nivel alto de CO<sub>2</sub><sup>(*)</sup></b>	
<i>pH fijado</i>	7,20 ± 0,05
<i>Periodo de estudio</i>	8 mayo 2014
<i>Aporte nutrientes</i>	700 mg KNO <sub>3</sub> 50 mg de KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
<i>Toma de muestra</i>	<i>Agua del acuario</i> Muestreo inicial (sin aporte) Muestreo después del aporte: durante todo el día se recogen muestras cada 2 h (de 10 a 20 h).
<b>Nivel alto de CO<sub>2</sub><sup>(*)</sup></b>	
<i>pH fijado</i>	7,20 ± 0,05
<i>Periodo de estudio</i>	13 mayo 2014
<i>Aporte nutrientes</i>	No
<i>Toma de muestra</i>	<i>Agua del acuario</i> Muestreo durante todo el día, cada 2 h (de 10 a 20 h).

(\*) Se repite toma muestra el 28 de marzo.

(\*\*) Esta planificación se repite la semana del 7 al 11 de abril 2014.

### 5.3.- Determinación de Iones Nitrato

Para la determinación de iones nitratos en agua es importante tener en cuenta la presencia de especies interferentes así como los rangos de concentración de las diversas técnicas que existen. Las técnicas más empleadas para su determinación son la cromatografía iónica, electroforesis capilar o espectroscopia de absorción molecular UV-Vis.

En el presente trabajo se selecciona la espectroscopia de absorción molecular por ser una técnica sensible y disponible en la mayor parte de los laboratorios. Además, es la técnica empleada en muchos métodos oficiales o de referencia para la determinación de iones nitrato.

### 5.3.1.- Determinación Directa

La determinación directa de los iones nitrato empleando la técnica de espectroscopia de absorción molecular UV-Vis se puede llevar a cabo ya que este ion presenta un máximo de absorción a 220 nm. En este trabajo se evaluó la viabilidad de este método para las muestras objeto de estudio, ya que es importante tener en cuenta las posibles interferencias que pueden afectar a la medida directa. El procedimiento seguido es el establecido como Método Estándar para aguas y aguas residuales por la Asociación Americana de Salud Pública (APHA).<sup>[15]</sup>

Se preparan las siguientes disoluciones:

-Disolución patrón de nitrato potásico: se pesan 0,20 g de  $\text{KNO}_3$  en balanza granataria y se secan en la estufa a  $100^\circ\text{C}$  durante 24 h. Al día siguiente se pesa una alícuota de 0,1256 g de la sal seca, se disuelven con agua ultrapura y se transfieren a un matraz aforado de 250 mL, al que se añaden 0,5 mL de cloroformo antes de enrasar para garantizar su conservación. La disolución resultante presenta una concentración de 308,4 mg  $\text{NO}_3^-/\text{L}$ .

-Disolución de ácido clorhídrico 1 N: se miden en probeta 21,0 mL del ácido concentrado comercial, se transfieren a un matraz aforado (con una cierta cantidad de agua ultrapura) y se enrasa a 250 mL.

Para llevar a cabo la cuantificación de los iones nitrato se construye una recta de calibrado desde 5 a 30 mg  $\text{NO}_3^-/\text{L}$ . Se pipetean los volúmenes adecuados de la disolución patrón de  $\text{NO}_3^-$  que se transfieren a matraces aforados de 25 mL, se añade 1 mL de HCl 1N y luego se enrasa con agua ultrapura. Estas disoluciones se preparan el mismo día del análisis.

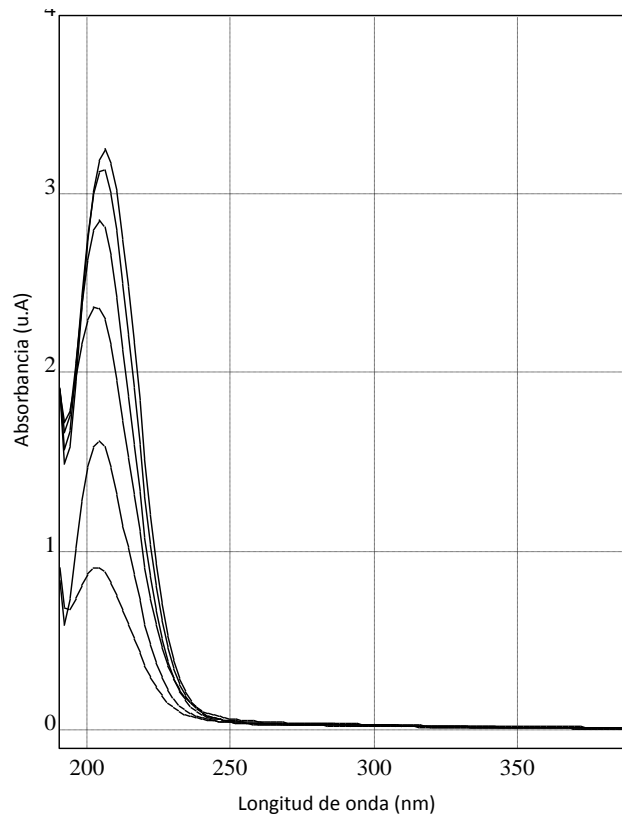
En la Figura 12 se muestran los espectros de absorción obtenidos para las disoluciones patrón. Se observa un buen solapamiento de los espectros registrados para las distintas concentraciones, y se selecciona la longitud de onda de 204 nm para realizar las posteriores medidas por corresponderse con la máxima absorbancia. Este máximo de absorción se registra a una longitud de onda ligeramente inferior a la indica en la bibliografía (220 nm), por lo que es importante la comprobación experimental con cada equipo instrumental.

---

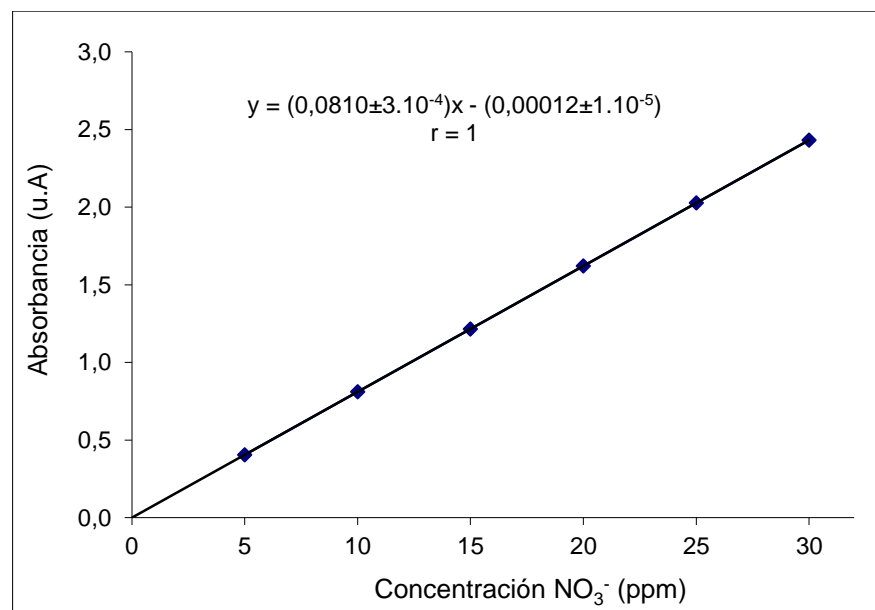
<sup>[15]</sup> APHA, American Public Health Association, American Water Works Association, Water Environment Federation, *Standard Methods for the examination of water and wastewater*. 22<sup>o</sup>ed.; Rice, E.W.; Baird, R.B.; Eaton, A.D.; Clesceri, L.S. (eds.) Maryland **2012**.



La recta de calibrado obtenida se representa en la Figura 13, todas las medidas se realizan con agua ultrapura en la celda de referencia.



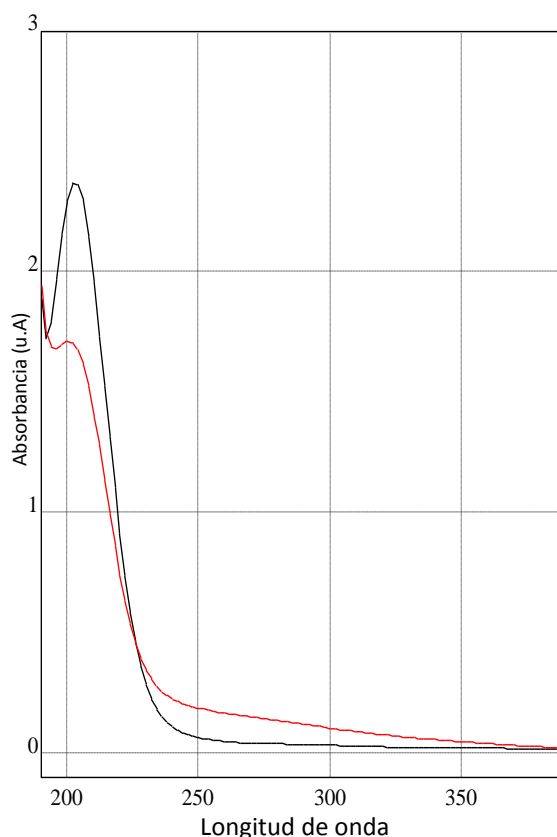
**Figura 12.** Espectros de absorción del  $\text{NO}_3^-$  para las disoluciones patrón de 5 a 30 mg/L.



**Figura 13.** Recta de calibrado obtenida para la determinación directa de iones  $\text{NO}_3^-$  mediante espectroscopia de absorción molecular UV-Vis ( $\lambda_{\text{máx}}=204$  nm)

Se observa una buena linealidad en el rango de concentraciones estudiado.

A continuación se analiza una muestra de agua del acuario, obteniéndose el espectro de la Figura 14. En esta figura también se registra el espectro de un patrón de 20 mg NO<sub>3</sub><sup>-</sup>/L, observándose que ambas disoluciones presentan un máximo de absorción a 204 nm, pero la muestra también produce una absorbancia significativa a 275 nm.



**Figura 14.** Espectros de absorción del NO<sub>3</sub><sup>-</sup> obtenidos para una disolución patrón de 20 mg/L (en negro) y una muestra de agua de pecera (en rojo).

Tal como se recoge en la bibliografía, <sup>[155,16]</sup> la materia orgánica presente en la muestra puede causar interferencia en la medida directa de los iones nitrato mediante este método. Esto se debe a que la materia orgánica puede absorber radiación a la misma longitud de onda a la que se obtiene la máxima absorbancia para los iones nitrato, y también absorbe radiación a 275 nm. Una segunda medida realizada a 275 nm se utiliza para corregir esta interferencia, ya que los iones nitrato no absorben a esta longitud de onda. No obstante, esta corrección empírica está relacionada con la naturaleza y concentración de la materia orgánica y puede variar de un tipo de agua a otro, ello hace que no se recomiende usar esta

<sup>[16]</sup> G. Cepriá, A. Escudero, M. Sierra. *Análisis Instrumental en el Laboratorio*, 2ªed., Prensas Universitarias de Zaragoza, Zaragoza, **2007**.

aproximación si existe una interferencia significativa. Es decir, si el valor de corrección es superior al 10% de la lectura a 204 nm no se podrá usar.

Se realizan las medidas de la muestra a 275 nm y se comprueba que el valor de absorbancia debida a la materia orgánica supera en un 10% el valor obtenido a 204 nm. Por lo tanto, este método directo no se considera adecuado para analizar las muestras que se deben analizar en este trabajo.

### 5.3.2.- Determinación mediante el Método de la Derivada

En los casos en que no es posible aplicar el método directo para la determinación espectrofotométrica de los iones nitrato se recomienda emplear el método de la segunda derivada.

En general, la espectroscopia de derivadas se emplea para resolver espectros de diferentes componentes químicos cuyas bandas de absorción se superponen en el espectro normal, ya que permite magnificar la estructura fina de las curvas espectrales. Además, es posible realizar el análisis cuantitativo de sustancias sin necesidad de realizar una separación previa de las mismas y también reduce los efectos de interferencias debidas a dispersión, matriz u otros compuestos absorbentes.<sup>[17]</sup> No obstante, las derivadas de los espectros son siempre más complejos que el espectro de orden cero.

La primera derivada  $dA/d\lambda$  representa la pendiente de cada punto de la banda de absorción y, cuando la banda de absorción se puede asimilar a una curva gaussiana,  $dA/d\lambda$  será igual a cero en el máximo de la banda de absorción. Cuando la especie que interfiere presenta un máximo de absorción igual al del analito así como un ancho de banda similar, la primera derivada no proporciona información suficiente para distinguirlos.

En la segunda derivada los valores de  $d^2A/d\lambda^2$  son igual a cero en los puntos de inflexión de la banda de absorción. Por lo que presentará una banda negativa con un mínimo a la misma longitud de onda que la del máximo de la banda de orden cero. Esta derivada también presenta dos bandas satélite positivas, a cada lado de la banda principal.

Savitzky y Golay desarrollaron un método muy eficaz para realizar los cálculos de las derivadas que son la base del algoritmo de derivación en la mayoría de los instrumentos comerciales, tal como es el caso del que empleamos en este estudio. Este método también suaviza los datos. Experimentalmente se deben establecer el orden del polinomio ( $l$ ) y el número de datos ( $2n+1$ ) en la ventana para el ajuste por mínimos cuadrados que permitan

---

<sup>[17]</sup> A. Ríos, M.C. Moreno, B.M Simonet, *Técnicas Espectroscópicas en Química Analítica. Volumen I: Aspectos básicos y espectrometría molecular*. Editorial Síntesis, S.A., Madrid **2012**.

obtener una aproximación suavizada a los puntos originales de los datos más fácilmente interpretables.

En este trabajo, se llevaron a cabo ensayos con disoluciones patrón de iones nitrato para seleccionar las condiciones óptimas para la obtención de la segunda derivada. Todas las medidas se realizan con agua ultrapura en la celda de referencia. Se fijó un  $\Delta\lambda$  de 8 y se seleccionó el suavizado que permitió establecer la longitud de onda de medida más adecuada para la medida de los iones nitrito.

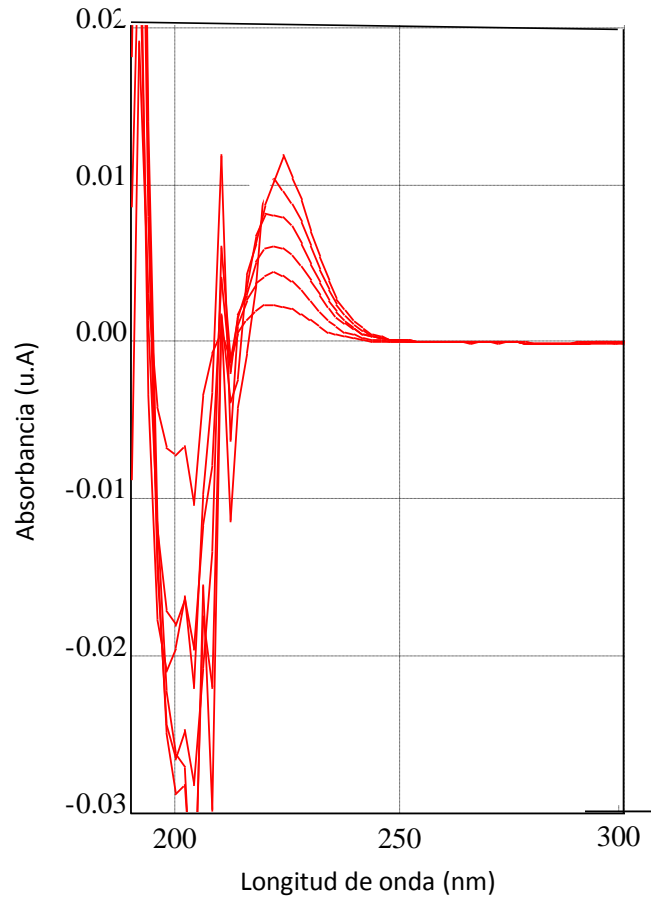
Una vez establecidas los parámetros del análisis, se registraron los espectros derivados para las disoluciones patrón de 5 a 30 mg/L y se muestran en la Figura 15. Se observa una mayor complejidad para establecer la longitud de onda de medida ya que hay presentes picos positivos y negativos. Un perfil similar es obtenido por Crumpton y cols.<sup>[18]</sup> para patrones de iones nitrato empleados para el análisis de aguas superficiales. Estos autores seleccionan la longitud de onda del pico positivo obtenido en la segunda derivada a 224 nm para realizar las medidas, teniendo en cuenta que este máximo se desplaza ligeramente a concentraciones mayores.

En nuestro caso, el máximo del segundo pico positivo de la segunda derivada del espectro se registra a 222 nm, por lo que se selecciona esta longitud de onda para realizar las medidas de patrones y muestra. Se construye la correspondiente curva de calibrado, ya que suponiendo que el espectro de orden cero obedece la ley de Lambert-Beer, existe una relación lineal similar entre la concentración y la amplitud para todos los órdenes de espectros derivados.

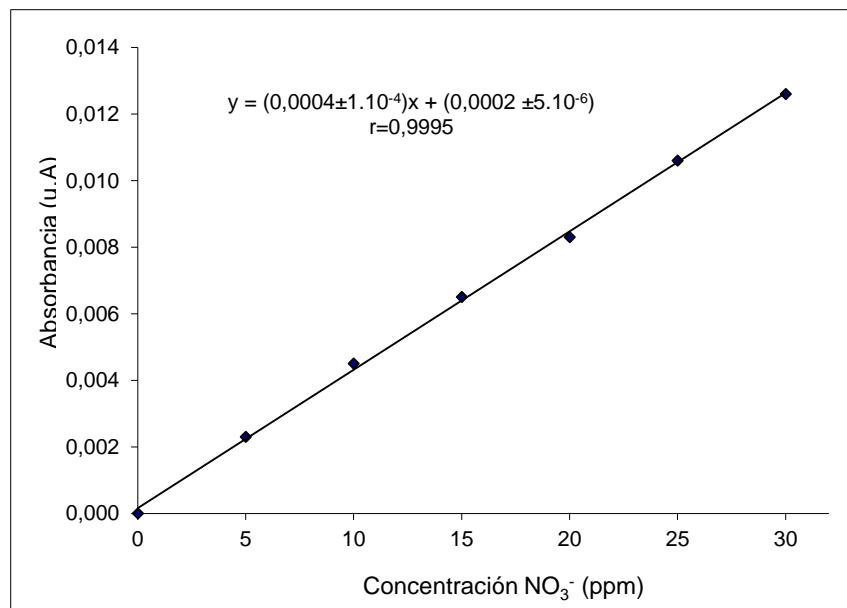
En la Figura 16 se representa la curva de calibrado obtenida, observando una relación lineal entre la amplitud del pico de la segunda derivada y la concentración de  $\text{NO}_3^-$  en el rango considerado.

---

<sup>[18]</sup>W.G. Crumpton, T.M. Isenhardt, P.D. Mitchell, *Limnol. Oceanogr.*, **1992**, 37(4), 907-913.



**Figura 15.** Segunda derivada de los espectros de absorción de las disoluciones patrón de  $\text{NO}_3^-$ : 5, 10, 15, 20, 25 y 30 mg/L.



**Figura 16.** Recta de calibrado obtenida para la determinación de  $\text{NO}_3^-$  calculando la segunda derivada de los valores registrados a  $\lambda_{\text{máx}}=222$  nm.

#### 5.4.- Determinación de Iones Nitrito

Existen numerosos métodos para la determinación de iones nitrito en muestras ambientales que se basan en la espectrofluorimetría, cromatografía, potenciometría, electroforesis capilar, sensores de membrana, electroanálisis, etc. Sin embargo, muchos de ellos son costosos y laboriosos por lo que siguen siendo muy utilizados los métodos espectrofotométricos.

Los iones nitrito no absorben radiación en la región ultravioleta o visible del espectro electromagnético, pero presentan la particularidad de formar compuestos coloreados que sí podrán determinarse mediante medidas espectrofotométricas en la región del visible. Muchos de estos métodos se basan en la reacción de Griess. El ion nitrito reacciona con una amina aromática primaria para formar una sal de diazonio, la cual se enlaza con otro compuesto aromático para formar un azo complejo con una alta absorptividad. Este método se ha aplicado usando diferentes combinaciones de reactivos, por ejemplo combinando sulfanilamida, sulfametizol y sulfadimidina con 1-naftol-4-sulfonato de sodio; 4-nitroanilina con 1-naftol; ácido sulfanílico con 1-naftol; etc. La formación de este azo complejo está afectada por el pH, temperatura, concentración de reactivos y tiempo. <sup>[19]</sup>

En este trabajo se siguió el procedimiento establecido por la APHA <sup>[15]</sup> para la determinación de iones nitrito en aguas y aguas residuales. Básicamente consiste en hacer reaccionar los iones nitrito con la sulfanilamida en medio ácido, produciéndose un diazocompuesto que mediante una reacción de copulación con la N-(1-naftil)-etilendiamina forma un compuesto coloreado.

Se preparan las siguientes disoluciones:

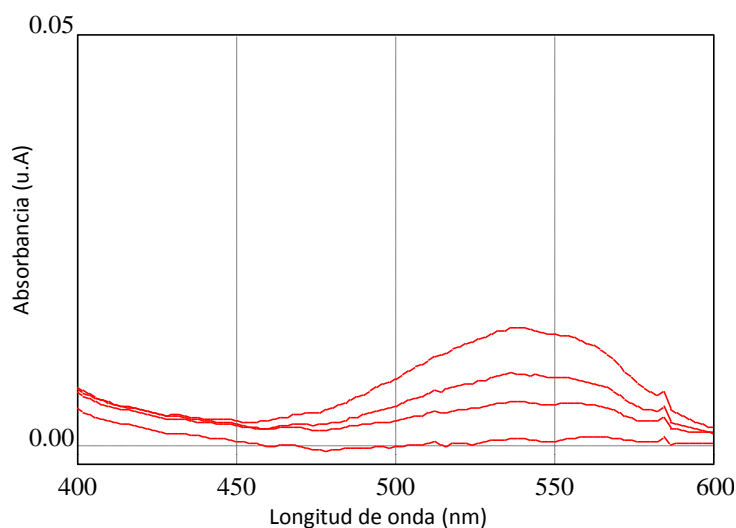
- Disolución patrón de nitrito sódico: se pesan 0,19 g de nitrito sódico en balanza granataria, se disuelven en agua ultrapura, se transfieren a un matraz de 500 mL y finalmente se enrasa con agua ultrapura. El nitrito sódico comercial no cumple las especificaciones de patrón primario, por lo que la disolución resultante se valora con una disolución de permanganato potásico (0,1016 M) previamente valorada con ácido oxálico, para su estandarización. La disolución patrón presentó una concentración de 229,1mg NO<sub>2</sub><sup>-</sup>/L.
- Disolución intermedia de nitrito sódico: se prepara una disolución con una concentración 5 veces menor que la del patrón preparado a partir de la sal sódica del ion nitrito. Se pipetea 5 mL de la disolución patrón de NO<sub>2</sub><sup>-</sup> que en un matraz aforado se llevan a un volumen final de 250 mL con agua ultrapura.

<sup>[19]</sup> M. Irandoust, M. Shariati-Ras, M. Haghghi, *Anal. Methods*, **2013**, 5, 5977-5982.

- Disolución del reactivo colorante: en un vaso de precipitados se vierten 80,0 mL de agua ultrapura, 10,0 mL de ácido fosfórico y 1,00 g de sulfanilamida (en este orden) y se agita hasta total disolución. A continuación se añaden 0,10 g de clorhidrato de N-(1-naftil)-etilendiamina y se agita hasta que se disuelva por completo. Se diluye hasta 100 mL con agua desionizada y se guarda en un frasco color topacio refrigerada a 4 °C. En estas condiciones, la disolución es estable durante un mes.

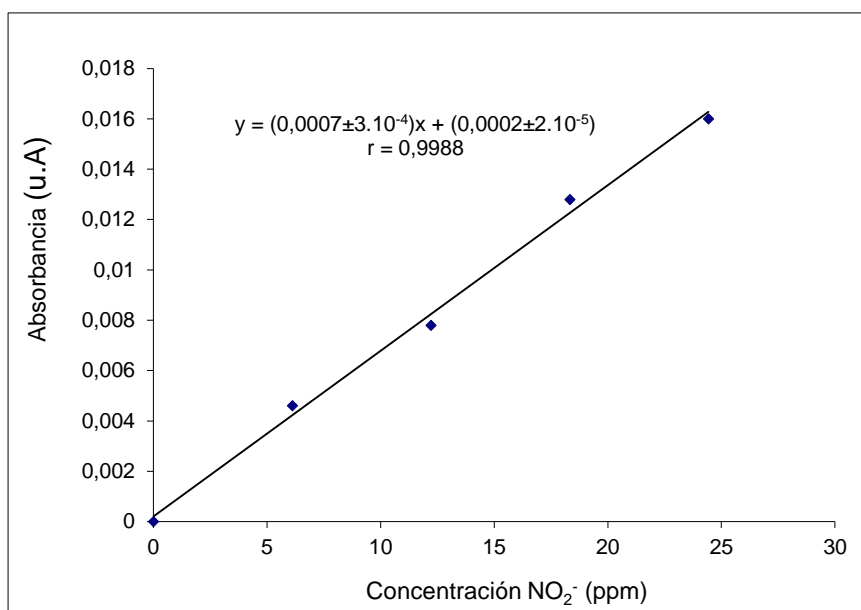
A partir de la disolución intermedia de iones nitrito, se preparan las disoluciones patrón adecuadas para construir la recta de calibrado entre 5 y 25  $\mu\text{g NO}_2^-/\text{L}$ . Se pipetea los volúmenes adecuados del patrón, se transfieren a matraces aforados de 25 mL y se les añaden 2,5 mL del reactivo complejante. Se tapa el matraz, se agita y se esperan 10 minutos antes de enrasar. El color de la disolución resultante es estable durante aproximadamente 2 horas.

Se registran las absorbancias entre 400 y 600 nm (Figura 17) y se selecciona la longitud de onda de 543 nm para realizar las medidas siguientes, por corresponderse con el máximo de absorción. Este valor de longitud de onda coincide con la recogida en la bibliografía.



**Figura 17.** Espectros de absorción para las disoluciones patrón de  $\text{NO}_2^-$ , 5 a 25  $\mu\text{g/L}$ .

Utilizando los valores de absorbancia registrados a 543 nm se construye la correspondiente curva de calibrado que se representa en la Figura 18.



**Figura 18.** Recta de calibrado obtenida para la determinación de NO<sub>2</sub><sup>-</sup> previa formación diazocompuesto coloreado ( $\lambda_{\text{máx}}=543$  nm).

El análisis de las muestras se realiza inmediatamente después de su recogida, ya que el ion nitrito es inestable pudiendo transformarse en ion nitrato. Se tratan de igual forma que las disoluciones patrón y se registra la absorbancia a 543 nm.

### 5.5.- Determinación de Iones Amonio

La determinación de iones amonio se puede realizar empleando técnicas electroquímicas de electrodos selectivos de iones, cromatografía iónica, electroforesis capilar, etc. Haciendo uso de la experiencia del departamento de Química Analítica en el empleo de la técnica de electroforesis capilar para la determinación de aniones y cationes en muestras acuosas y teniendo en cuenta su sensibilidad, en este trabajo se optó por esta técnica.

Los análisis se hicieron en un equipo HP<sup>3D</sup>CE de Agilen acoplado con un detector de conductividad C<sup>4D</sup>-TraceDec. Se ha utilizado un capilar de sílice fundida de 50  $\mu\text{m}$  de diámetro interno y 50 cm de longitud total, colocándose el detector de conductividad a una distancia de 14 cm de uno de los extremos.

El electrolito utilizado es 50 mM MES 50 mM HIS y 2 mM 18crown-6. El voltaje aplicado fue de 30 kV y se ha termostatizado el capilar a 25 °C.

La muestra se inyectó de forma hidrodinámica, por el lado largo del capilar aplicando una presión de 50 mbarx5s. En estas condiciones, el método de análisis presenta un límite



de detección de 0,03 mg NH<sub>4</sub><sup>+</sup>/L y una reproducibilidad de tiempos de migración inferior al 1%, y en áreas próxima al 9%.<sup>[20]</sup>

## 5.6.- Determinación de la Dureza del agua

El término dureza del agua se aplicó en principio para representar al agua en la que era difícil (duro) de lavar y se refiere al consumo de jabón para lavado. En la mayoría de las aguas alcalinas esta necesidad de consumo de jabón está directamente relacionada con el contenido de cationes polivalentes.

Fundamentalmente las sales disueltas de calcio y magnesio presentes en el agua son las responsables de la dureza y, en menor medida, de otros metales divalentes como el hierro. Cualquiera que sea su origen, se expresa en mg/L de CaCO<sub>3</sub>.

La determinación de la dureza del agua se lleva a cabo, de forma general, empleando un método complexométrico basado en el poder complejante del AEDT (ácido etilendiaminotetracético), el cual reacciona con los iones Ca<sup>2+</sup> primero y Mg<sup>2+</sup> después, dando complejos levemente ionizados. Se utiliza un indicador químico para detectar el punto final de la valoración, el negro de eriocromo T, que es de color rojo en presencia de estos cationes y vira a azul cuando estos se encuentran complejados o ausentes.

Como el complejo del AEDT con el Ca<sup>2+</sup> y Mg<sup>2+</sup> es más fuerte que el que estos iones forman con el negro de eriocromo T, la competencia por los iones se desplaza hacia la formación de los complejos con AEDT, desapareciendo el color rojo inicial de la disolución y tornándose azul al alcanzar el punto final.

En esta valoración es fundamental controlar el pH, el cual debe ajustarse con una disolución tampón a 10, ya que a valores superiores precipitaría el hidróxido de magnesio. El control del pH también favorece la selectividad del método.

Esta metodología es la establecida en el Método Oficial de análisis de aguas superficiales por la *Association of Official Agricultural Chemists* (AOAC International) y se usará en el presente trabajo para determinar la dureza del agua del acuario.<sup>[21]</sup>

---

<sup>[20]</sup> Book of abstracts of the XII Scientific Meeting of the Spanish Society of Chromatography and Related Techniques SECyTArragona, **2012**.

<sup>[21]</sup> Official Methods of Analysis of AOAC International, Method 973.52 Hardness of water, 18<sup>th</sup> edition, Revision 1, Maryland, **2006**.

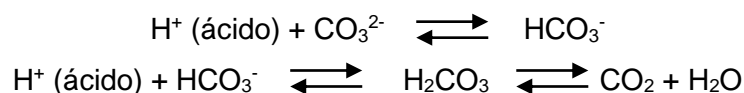
Se preparan las siguientes disoluciones:

- Disolución de AEDT: se pesan 1,8665 g de AEDT, se disuelven en un vaso de precipitados y se llevan a un volumen final de 500 mL con agua ultrapura, en un matraz aforado.
- Disolución reguladora pH=10 de  $\text{NH}_4^+/\text{NH}_3$ : se pesan 35,00 g de cloruro de amonio en balanza granataria y se miden 280 mL de amoníaco con probeta, se mezclan en un vaso de precipitado, se disuelve la sal y se transfiere la disolución a un matraz aforado de 500 mL, que se enrasa con agua ultrapura.
- Negro de eritocromo T: se utiliza en forma sólida preparado al 0,5% en NaCl. Para ello se pesan 0,25 g de negro de eriocromo T y se mezclan en un mortero con 49,75 g de NaCl. Se pulveriza la mezcla para obtener un polvo fino, lo más homogéneo posible.

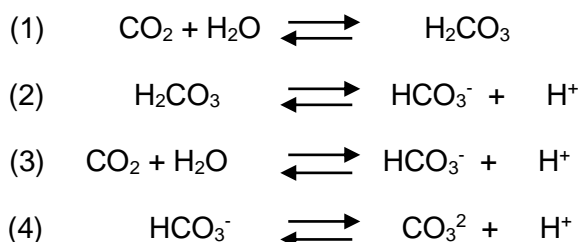
Para realizar la valoración se pipetea 20 mL de la muestra, se transfieren a un matraz Erlenmeyer, se añade un 1 mL de la disolución reguladora y una punta de espátula de negro de eritocromo T se agita la mezcla. Desde la bureta se vierte la disolución patrón de AEDT, despacio y agitando continuamente el matraz, hasta que se produce el cambio de color de rosa a azul. Todas las muestras se valoraron por triplicado y se utilizó el volumen medio consumido de valorante para calcular la dureza expresada en mg/L de  $\text{CaCO}_3$ .

### 5.7.- Determinación de la Alcalinidad

La alcalinidad de las aguas se puede definir como su capacidad para neutralizar ácidos o aceptar protones, y se debe principalmente a la presencia de iones bicarbonato y carbonato y, ocasionalmente, por los iones fosfatos, silicatos, hidróxidos y boratos. Puede haber aguas con el mismo pH y distinta alcalinidad ya que el pH depende de la relación  $[\text{HCO}_3^-]/[\text{CO}_2]$  y  $[\text{HCO}_3^-]/[\text{CO}_3^{2-}]$ , y no a las cantidades totales de cada una de ellos. Si añadimos un ácido, este es neutralizado de acuerdo a las siguientes reacciones:



En este trabajo se aportan distintas cantidades de  $\text{CO}_2$  al agua del acuario para realizar los ensayos, lo cual influirá tanto en la alcalinidad como en el pH del medio teniendo en cuenta los siguientes equilibrios que describen las interacciones del  $\text{CO}_2$  con el agua.



Dado que la concentración de ácido carbónico es generalmente baja, las dos primeras ecuaciones se combinan para formar el equilibrio descrito en la ecuación (3). La especie formada, bicarbonato, también podrá participar en el equilibrio descrito en la ecuación (4).

Es evidente que las proporciones de todas estas especies iónicas del dióxido de carbono se podrán alterar significativamente por cambios en el pH. A un pH < 6, el CO<sub>2</sub> es la especie dominante. A valores de pH entre 7 y 9, predomina el HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>, mientras que los iones CO<sub>3</sub><sup>2-</sup> comienzan a aumentar su concentración a valores de pH > 9. El sistema de alcalinidad tiene interacciones importantes con los procesos de fotosíntesis y respiración que tienen lugar en los sistemas biológicos. <sup>[22]</sup>

La alcalinidad se expresa como *alcalinidad de fenoftaleína* o *alcalinidad total*. Ambas formas se determinan por valoración con ácido sulfúrico o ácido clorhídrico, y se emplean dos indicadores químicos o un pH metro para detectar los puntos finales. La correspondiente curva de valoración presentará dos puntos de equivalencia, el primero a un pH próximo a 8,3 y el segundo a un pH en torno a 4,5. Si la muestra presenta valores de pH comprendidos entre 4,2 a 8,3 se corresponde con disoluciones que contienen bicarbonatos y dióxido de carbono libre; si está entre 8,3 y 11 se corresponde con disoluciones de carbonatos e hidróxidos disueltos; y cuando son mayores de 11 se corresponden con disoluciones de hidróxidos. Estos valores se establecen teniendo en cuenta las constantes de equilibrio de las especies indicadas.

En este estudio se emplea la detección potenciométrica del punto final, y se describe a continuación el procedimiento seguido, basado en el método AOAC. <sup>[23]</sup>

<sup>[22]</sup> F.Fuentes, A. Massol-Deyá. Manual de Laboratorios: Ecología de Microorganismos. Ed. Universidad de Puerto Rico. Puerto Rico, **2002**.

<sup>[23]</sup> Official Methods of Analysis of AOAC International, Method 973.43 Alkalinity of water, 18<sup>th</sup> edition, Revision 1, Maryland, **2006**.

Las disoluciones requeridas son:

- Disolución de ácido clorhídrico 0,05 M: se miden con probeta 25,0 mL de una disolución de HCl 1 M (descrita en el apartado 5.3.1), se llevan a un matraz aforado de 500 mL y se enrasa con agua ultrapura. Como el ácido clorhídrico no es patrón primario se determinará su concentración exacta mediante valoración con una disolución de carbonato sódico.
- Disolución de carbonato sódico 0,0100 M: se pesan 0,1055 g de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (anhidro y desecado en estufa durante 2 h a 105 °C), se disuelven con un pequeño volumen de agua en un vaso de precipitados y se transfieren a un matraz aforado de 100 mL que se enrasa con agua ultrapura. La disolución resultante tiene una concentración molar de 0,0099 M.

Se lleva a cabo la estandarización de la disolución de HCl. Para ello se pipetea 20 mL de la disolución patrón de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  0,0099 M, se colocan en un matraz Erlenmeyer, se añaden 3-4 gotas del indicador Naranja de Metilo y se valoran con el HCl de concentración aproximada 0,05 M, que se vierte lentamente desde la bureta hasta viraje del indicador. En todo momento se mantiene la agitación del matraz Erlenmeyer para favorecer la reacción de neutralización. Esta valoración se realiza por triplicado, se anotan los volúmenes consumidos y se calcula la concentración del ácido, obteniéndose un valor de 0,0473 M.

A continuación se valoran potenciométricamente las muestras. Se miden de forma exacta (con bureta) 50 mL de la muestra, se vierten en un vaso de precipitados de 100 mL de capacidad. En él se sumerge el electrodo combinado de pH y se mantiene una agitación suave (con agitador magnético) hasta el final de la valoración. Se comienza a verter el valorante (HCl) desde la bureta y se registra el pH inicial de la disolución y después de la adición de cada mililitro del ácido. A modo de ejemplo, en la Figura 19 se presenta la curva de valoración obtenida para una muestra de agua del acuario.

Una vez obtenida la curva de valoración se calcula su primera y segunda derivada, estableciendo el punto final de manera exacta. Tal como se observa en la figura anterior, la muestra carece de iones carbonato ya que sólo presenta una zona de inflexión correspondiente a la neutralización de los iones bicarbonato presentes en la muestra. Estos iones representarán la alcalinidad total de la muestra, la cual se expresa como mg  $\text{CaCO}_3/\text{L}$ .

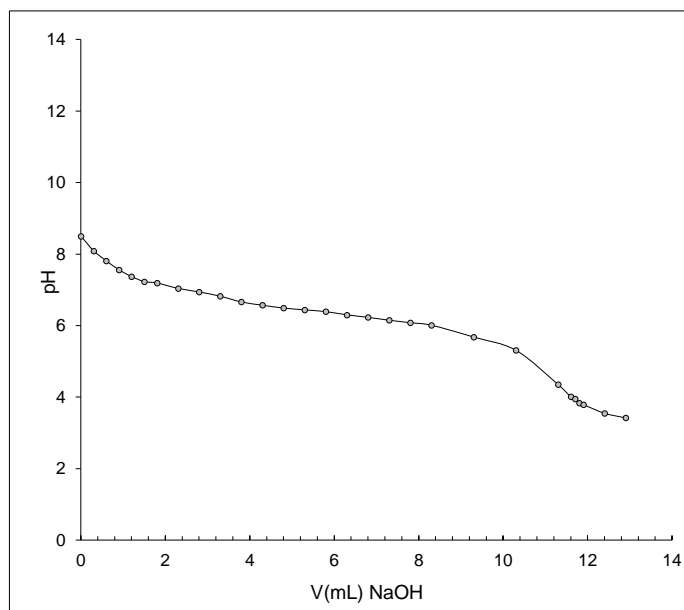


Figura 19. Curva de valoración potenciométrica obtenida para una muestra de agua

### 5.8.- Determinación del pH

La determinación del pH en muestras de agua de diversa naturaleza es de gran relevancia debido a su influencia en numerosos procesos que tienen lugar en el medio considerado.

Para su medida se emplea un potenciómetro dotado con un electrodo combinado de pH, que debe calibrarse antes de su uso con las disoluciones tampón de pH 4,00 y 7,02. Es conveniente agitar suavemente la disolución durante la medida para favorecer el equilibrio que se establece en la membrana de vidrio y conseguir una lectura estable en pocos minutos.

En este trabajo se midió el pH de las muestras de agua del acuario, inmediatamente después de su toma de muestra. Se observó que la lectura no se estabilizaba y que el valor de pH se incrementaba con el tiempo. Esto puede deberse a que parte del  $\text{CO}_2$  disuelto se desprende al estar la muestra en contacto con el ambiente ya que este gas participa en el equilibrio ácido base que regula.

Como el sistema del acuario cuenta con un controlador de pH, se compararon los valores obtenidos por ambos medios. No se observaron diferencias de  $\pm 0,01$  unidades por ambos instrumentos midiendo el pH justo en el momento de la toma de muestra. Por lo que se optó por registrar el pH en el controlador del sistema.

### 5.9.- Determinación de la Conductividad

La conductividad de una disolución viene determinada por la resistencia que ofrece al paso de la corriente y nos da información sobre el contenido total de iones disueltos ya que todos ellos son los responsables del transporte de la corriente a través de la disolución. Este parámetro está determinado por la naturaleza y concentración de los electrolitos presentes, y depende de la temperatura.

Para llevar a cabo la determinación de la conductividad de las muestras bajo estudio se empleó un conductímetro y las muestras se sometieron a agitación magnética durante la medida, hasta su registro. Es importante realizar el calibrado previo del instrumento con las disoluciones patrón de KCl (12,88 y 1,413 mS/cm) y mantener todas las disoluciones a medir a temperatura ambiente. <sup>[24]</sup>

### 5.10.- Determinación del contenido de Nitrógeno en plantas

Con objeto de comprobar si las condiciones ensayadas han influido en el contenido en nitrógeno (N) que han absorbido las plantas que se desarrollan dentro del acuario, se optó por llevar a cabo la determinación de la concentración de nitrógeno (N) en dichas muestras. Se complementan estos ensayos con la determinación de carbono y carbono orgánico total (COT).

La toma de muestra de las plantas se llevó a cabo al finalizar cada semana en las que se variaron las condiciones del sistema. Se recogieron directamente del acuario, empleando una tijera y procurando hacer el corte a la misma altura en cada toma de muestra. A continuación se introducen en una bolsa de polietileno con cierre hermético y se congelan. Una vez congeladas, se secan mediante liofilización durante 48 h.

Para conseguir una muestra homogénea y representativa para su posterior análisis elemental, se someten a molienda empleando un molino de discos (Figura 20). Es suficiente 1 minuto de molienda a 1100 rpm para obtener una muestra de aspecto homogéneo, con un tamaño de partícula inferior a 20  $\mu\text{m}$ .

---

<sup>[24]</sup> Official Methods of Analysis of AOAC International, Method 973.40 Specific Conductance of water, 18<sup>th</sup> edition, Revision 1, Maryland, **2006**.



**Figura 20.** Molino de discos

La determinación del contenido en nitrógeno, carbono y carbono orgánico total se realiza en la Unidad de Técnicas Instrumentales de Análisis (UTIA) de los Servicios de Apoyo a la Investigación (SAI) de la UDC. Para ello se requiere una cantidad de muestra del orden de 1-2 mg, por lo que se intentó garantizar la homogeneidad de la muestra.

## 6.- Resultados y Discusión

### 6.1.- Agua de Acuario

Los ensayos llevados a cabo en este trabajo tienen por objeto comprobar si al añadir una cierta cantidad de un nutriente nitrogenado (en forma de iones nitrato) a un acuario plantado de agua dulce, el sistema biológico los consumirá a lo largo de un ciclo semanal de estudio o por el contrario obtendrá el nitrógeno de otras fuentes presentes en el medio. Y este proceso se evaluará aportando al sistema distintos niveles de  $\text{CO}_2$ .

Aportando un nivel bajo de  $\text{CO}_2$  al sistema ( $\text{pH}=7,40\pm 0,05$ ) se obtienen los resultados mostrados en la Figura 21, de acuerdo con la sistemática establecida. Señalar que los iones amonio no se detectaron en ninguna muestra ( $< 0,03 \text{ mg/L}$ ) y los iones nitrito no se pudieron cuantificar por presentar las muestras valores inferiores a  $5 \mu\text{g/L}$ , concentración mínima para la cual se recomienda el método empleado.<sup>[19]</sup>

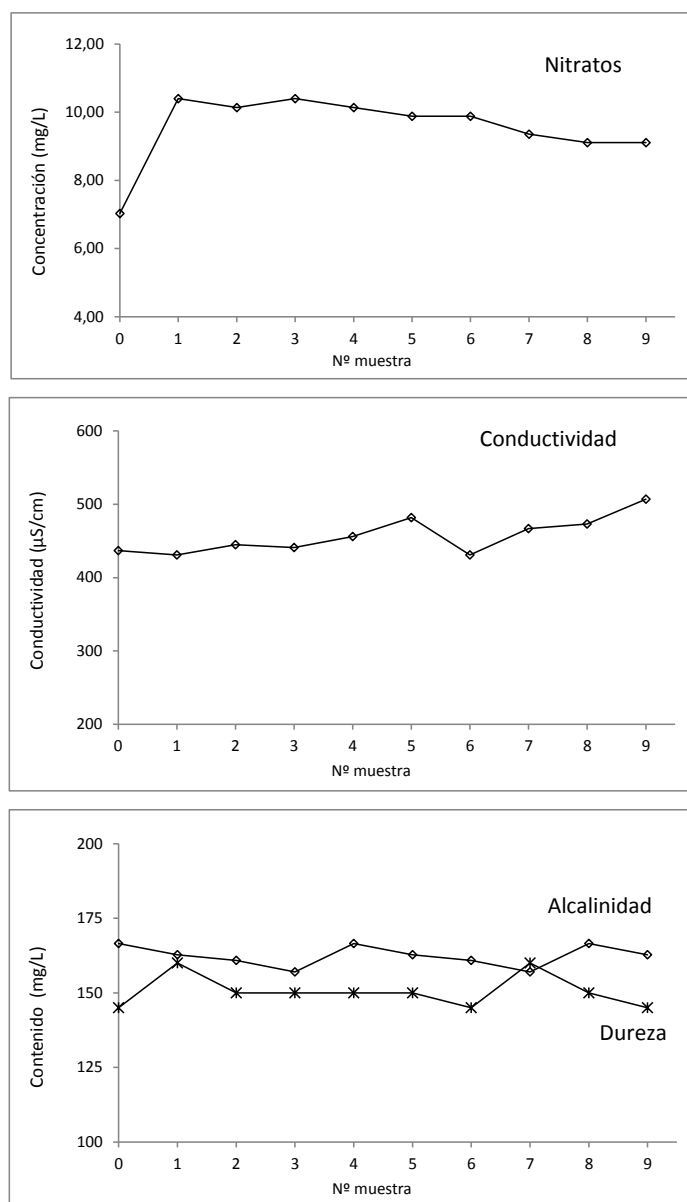
La concentración de iones nitrato se incrementó con el aporte del  $\text{KNO}_3$ , pasando de  $7,01$  a  $10,40 \text{ mg/L}$ . Una vez completada la adición del nutriente, el contenido de los iones nitrato va disminuyendo en pequeña cantidad a lo largo de los tres días consecutivos de análisis, alcanzándose un 12% de consumo total del  $\text{NO}_3^-$  añadido.

Tanto para la dureza como para la alcalinidad Todas las muestras presentan valores similares, de dureza y alcalinidad, sin cambios significativos a lo largo del periodo estudiado. La dureza se corresponde con un tipo de agua de dureza intermedia ( $151\pm 5 \text{ mgCaCO}_3/\text{L}$ ). Los niveles de conductividad no siguen una pauta definida ya que experimentan un ligero incremento hasta el segundo día de muestreo, luego baja y vuelve a incrementarse; aunque las variaciones son menores del 5% (DER) y los niveles se encuentran dentro de los valores normales para sistemas acuáticos de agua dulce, siendo muy inferiores al límite de  $1000 \mu\text{S/cm}$  establecido para la calidad de aguas superficiales en la Directiva 75/440/CE.

La alcalinidad presenta un valor prácticamente constante ( $162\pm 5 \text{ mgCaCO}_3/\text{L}$ ), lo cual es lógico ya que en las muestras no hay carbonatos ni hidróxidos, dependiendo solo la alcalinidad del contenido en iones bicarbonato. Estos iones en disolución acuosa mantienen un equilibrio con el  $\text{CO}_2$  disuelto, el cual está fijado durante el periodo de ensayo. El valor de alcalinidad de las muestras está dentro del rango considerado como adecuado para la vida de los peces ( $120\text{-}200 \text{ mg/L}$ ), presentando un buen poder amortiguador ácido-base; ya que a valores inferiores a  $20 \text{ mg/L}$  se pierde esta capacidad.<sup>[22]</sup>



De estos resultados podemos suponer que en un sistema como el estudiado la presencia de bacterias *Nitrosomonas* y *Nitrobacter* se encargan de convertir rápidamente los iones nitrito en  $\text{NH}_4^+$  y  $\text{NO}_3^-$ . Y que los iones amonio que se generan en el sistema son inmediatamente consumidos por él.



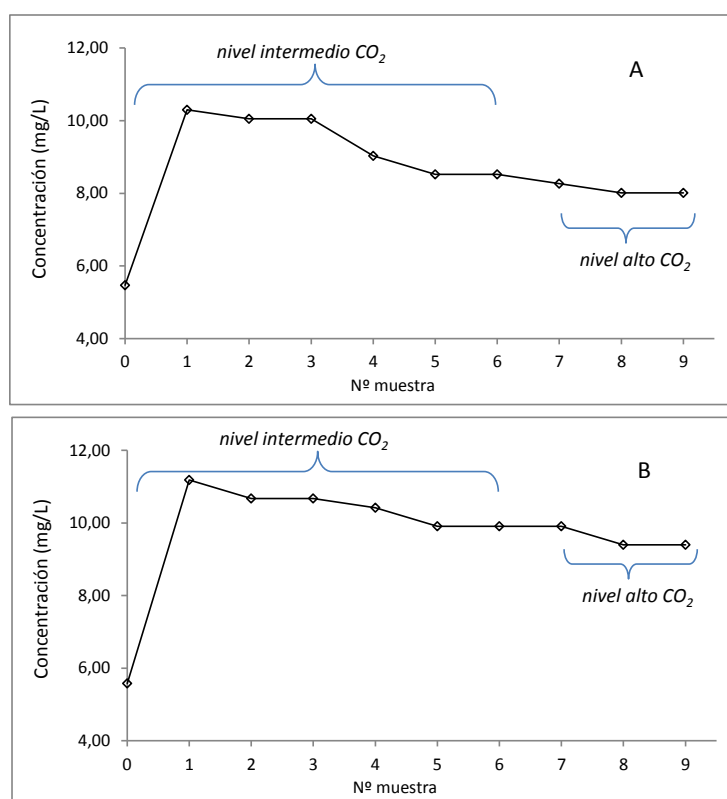
**Figura 21.** Resultados obtenidos para las muestras de agua con nivel bajo de  $\text{CO}_2$  ( $\text{pH}=7,40\pm 0,05$ ).

Cuando se incrementa el aporte de  $\text{CO}_2$  al sistema (nivel intermedio,  $\text{pH}=7,35\pm 0,05$ ), se observa en la Figura 22A una mayor disminución del contenido de nitratos en las muestras, lo que indica un incremento del consumo de nitratos, pasando del 5% al 17% en los dos primeros días de estudio. Esto puede deberse a un aumento de la actividad de todo

el sistema biológico, provocando que necesite consumir una mayor cantidad de nitratos. Se observó que las dos últimas muestras analizadas con este nivel intermedio tenían valores similares de iones nitrato, estabilizándose, por tanto, su consumo.

Con objeto de ver la respuesta del sistema, se incrementa el aporte de  $\text{CO}_2$  (nivel alto,  $\text{pH}=7,20\pm 0,05$ ) y se analizan 3 muestras en estas condiciones cuyos contenidos de nitratos descienden sólo ligeramente. En todo el ciclo estudiado, el consumo total de nitratos fue del 22%.

Al repetir los ensayos, una semana después, se observa (Figura 22B) que la disminución de la concentración de nitratos en el agua del acuario es más gradual que en caso anterior, y el consumo total también es algo inferior (16%). Se puede considerar que el sistema se reorganiza y readapta a las variaciones externas que sufre.

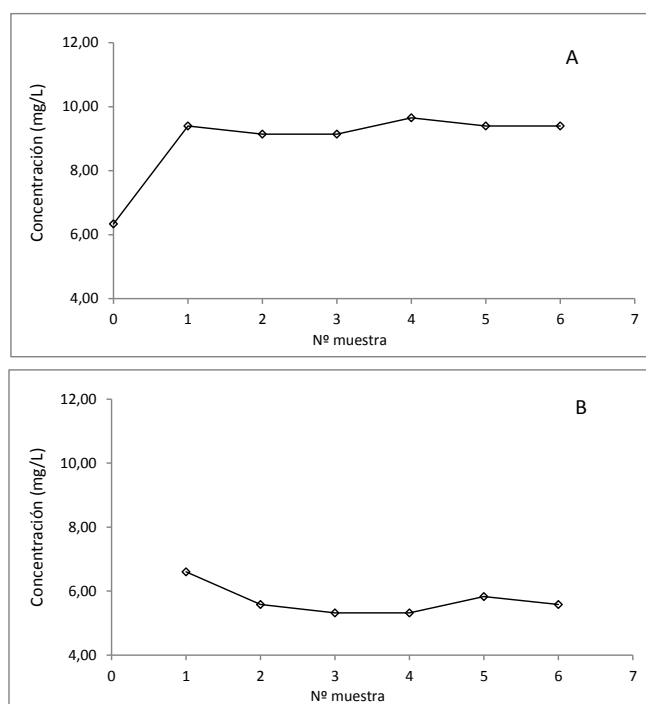


**Figura 22.** Evolución semanal del contenido de  $\text{NO}_3^-$  para las muestras de agua registradas para los dos periodos de estudio: A) 31-4 abril y B) 7-11 abril.

Los demás parámetros determinados en las muestras bajo estas condiciones experimentales no reflejan cambios significativos. Los iones nitrito y amonio tampoco se

podieron cuantificar por los bajos valores registrados. Tan solo señalar que la alcalinidad descendió ( $136 \pm 4$  mg  $\text{CaCO}_3/\text{L}$ ) como consecuencia del mayor aporte de  $\text{CO}_2$  al sistema.

Fijando un nivel alto de  $\text{CO}_2$  y con aporte inicial de nitratos se muestra en la Figura 23A que el consumo de nitratos se mantiene constante a lo largo de un día, no observando diferencia entre las muestras recogidas a lo largo de la mañana y de la tarde. Transcurridos cinco días se comprobó que el sistema había consumido todo el nitrato aportado (Figura 23B) y que el nivel se mantenía a lo largo de todo el día.

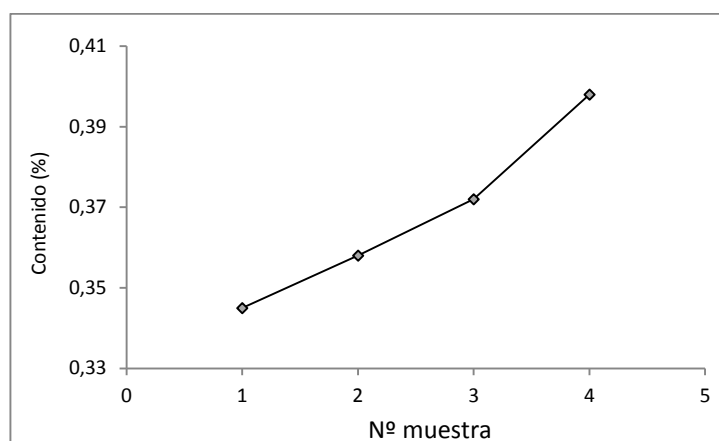


**Figura 23.** Evolución diaria del contenido de  $\text{NO}_3^-$  para las muestras de agua con nivel alto de  $\text{CO}_2$  ( $\text{pH}=7,20 \pm 0,05$ ), para los dos días de estudio: A) 8 mayo y B) 13 mayo.

## 6.2.- Biomasa vegetal del Acuario

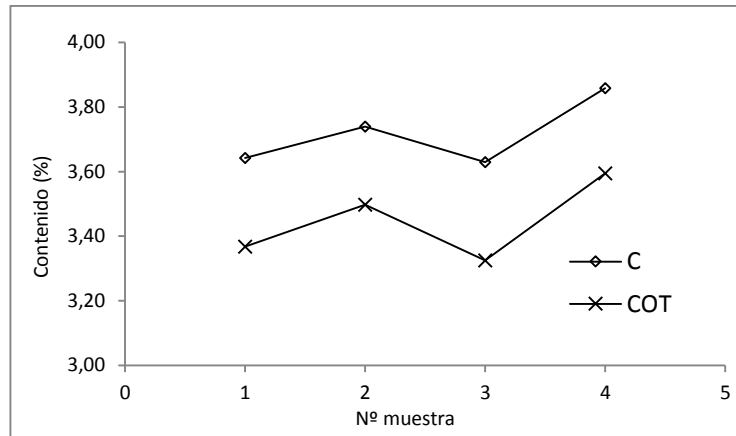
En la Figura 24 se muestran los contenidos de nitrógeno obtenidos para las muestras de biomasa vegetal analizadas. Las muestras 1 y 2 se corresponden con el período estudiado con nivel bajo de CO<sub>2</sub>, con masas de muestra de aprox.10 g. Las muestras 3 y 4 se tomaron al final de cada ciclo estudiado con nivel intermedio-alto de CO<sub>2</sub>, cuyas masas fueron del orden de 20 g.

Se observa un aumento significativo del contenido de nitrógeno en las plantas del acuario a medida que se incrementó la cantidad de CO<sub>2</sub> aportado. Esto puede deberse a su efecto potenciador de la actividad biológica causando un aumento de la absorción de nitrógeno en la biomasa vegetal. Además, otro factor que nos indica ese aumento en la actividad biológica es el mayor crecimiento de las plantas del acuario duplicándose la masa de muestra recogida en los dos últimos muestreos.



**Figura 24.** Contenido de Nitrógeno (%) en las muestras de plantas.

De manera complementaria se muestran los resultados obtenidos para la determinación del contenido de carbono y carbono orgánico total (COT) en las muestras (Figura 25). En ella se aprecia una tendencia de aumento de su contenido al incrementar el aporte de CO<sub>2</sub> al sistema.



**Figura 25.** Contenido de Carbono y COT (%) en las muestras de plantas.

Estos resultados constituyen una aproximación al efecto de las condiciones ensayadas sobre la biomasa desarrollada en el acuario, pero sería necesario disponer de un periodo más largo de estudio para obtener un número más representativo de muestras.

## 7.- Conclusiones

De los resultados presentados en esta memoria se pueden establecer las siguientes conclusiones.

El sistema estudiado, acuario plantado de agua dulce (80L), se comportó de forma diferente en función de los niveles aportados de CO<sub>2</sub>:

- Cuando la cantidad de CO<sub>2</sub> aportada es baja el sistema obtuvo una parte del nitrógeno, para la biosíntesis de proteínas y demás compuestos nitrogenados que participan en los ciclos biológicos, de los nitratos añadidos al agua en forma de KNO<sub>3</sub>. La cantidad consumida se estimó en un 12% del nitrato aportado.
- Al incrementar el aporte de CO<sub>2</sub> aumentó significativamente el consumo de nitratos a partir del KNO<sub>3</sub> añadido, alcanzando un valor del 22%.

Por lo que se confirma que el sistema ha incrementado su actividad biológica como consecuencia del aumento en el aporte de CO<sub>2</sub>.

Esta misma conclusión se puede establecer a partir de los resultados obtenidos para la biomasa vegetal producida del sistema, ya que su producción se duplicó y la cantidad de nitrógeno absorbida se incrementó en un 15% al aumentar el nivel de CO<sub>2</sub> en el sistema. No obstante, se requiere un estudio más extenso para poder corroborar estas conclusiones preliminares con un número de muestras representativo.

Transcurrido un periodo de tiempo suficiente el sistema consumió todo el nitrato aportado, alcanzando unos niveles constantes para este ion. Esto nos permite concluir que el sistema biológico se reequilibra a unas condiciones basales, destacando el papel principal que tiene el CO<sub>2</sub> como catalizador de estos procesos biogeoquímicos.

Se estudiaron también los niveles de nitritos y amonio presentes en el sistema y se observó que no se alcanzaban niveles cuantificables, lo cual nos lleva a concluir que estas especies se transforman en otras a través de los procesos descritos en el ciclo del nitrógeno, o bien son inmediatamente absorbidas por las especies vegetales presentes en el acuario.

Se puede establecer una comparativa con el papel del CO<sub>2</sub> en el efecto invernadero que se produce en la atmósfera terrestre. El incremento de la cantidad de CO<sub>2</sub> presente en la atmósfera está acelerando los procesos biológicos; sin embargo, es posible que estos procesos no hayan alcanzado su nuevo equilibrio. Al incorporar nutrientes a los diferentes ciclos biogeoquímicos que se producen sobre la superficie terrestre, el sistema global tiene un periodo de adaptación. No sabemos todavía cómo afectará a los sistemas vivos pero tal como hemos observado en nuestro pequeño sistema es posible que todos los ciclos estén

interrelacionados. Y que al cabo de cierto tiempo la actividad biológica compense este incremento de nutrientes y el sistema se reequilibre.

## Conclusions

The following conclusions can be drawn from the results presented in this report.

The studied system, Aquarium of fresh water (80L) containing a suite of plants, behaved differently as a function of the CO<sub>2</sub> levels provided:

- For the low levels of CO<sub>2</sub>, the system consumes part of the nitrogen provided as nitrates added to the water in the form of KNO<sub>3</sub>. This is used for the biosynthesis of proteins and other nitrogenous compounds involved in the biological cycles. The amount consumed was estimated as 12%.
- For higher levels of CO<sub>2</sub>, the consumption of nitrates enhanced significantly, reaching ca. 22%.

Therefore, it can be stated that the system increased its biological activity as a result of the increase in the CO<sub>2</sub> added to it.

The same conclusion can be set from the results obtained about the biomass produced by the system, as its production doubled and the amount of nitrogen absorbed increased by 15% (for the highest level of CO<sub>2</sub>). Nevertheless, these preliminary conclusions needs to be confirmed fully by a larger number of biomass samples.

It was observed that the system consumed all the nitrate contributions, achieving constant content of this ion. This suggests that after some time the biological system recovers baseline conditions, highlighting the leading role that CO<sub>2</sub> plays as a catalyst for these biogeochemical processes.

We studied also the levels of nitrites and ammonia present in the system although the experimental levels could not be quantified. Therefore, it seems that either these species are transformed to others through the processes described in the nitrogen cycle or are immediately absorbed by the plants in the Aquarium.

A comparison can be made here with the role of CO<sub>2</sub> as a greenhouse gas that occurs in the Earth's atmosphere. An increase in the amount of CO<sub>2</sub> in the atmosphere accelerates the biological processes; however, it is possible that such processes have not reached their new balance. By adding nutrients to different biogeochemical cycles that occur at the Earth's surface, the global system needs a adjustment period to reach an equilibrium. It is not know yet how this will affect living systems but according to what it was seen in our small system, it is possible that all cycles are interrelated. It is possible that, after some time the biological activity compensates the increase on the nutrients and the system re-equilibrates.



## Conclusións

Dos resultados presentados nesta memoria pódense establecer as seguintes conclusións.

O sistema estudado, acuario plantado de auga doce (80 L), comportouse de forma diferente en función dos niveis engadidos de CO<sub>2</sub>:

- Cando a cantidade de CO<sub>2</sub> engadida é baixa o sistema obtivo unha parte do nitróxeno para a biosíntese de proteínas e demais compostos nitróxenos que participan nos ciclos biolóxicos, dos nitratos engadidos á auga en forma de KNO<sub>3</sub>. A cantidade consumida estimouse nun 12% do nitrato engadido.
- Ao incrementar a achega de CO<sub>2</sub> aumentou significativamente o consumo de nitratos a partir do KNO<sub>3</sub> engadido, alcanzando un valor do 22%.

Polo que se confirma que o sistema incrementou a súa actividade biolóxica como consecuencia do aumento na achega de CO<sub>2</sub>.

Esta mesma conclusión pódese establecer cos resultados obtidos para a biomasa vexetal do sistema, xa que a súa produción se duplicou e a cantidade de nitróxeno absorbida se incrementou nun 15% ao aumentar o nivel de CO<sub>2</sub> no sistema. Non obstante, requírese un estudo máis extenso para poder corroborar estas conclusións preliminares cun número de mostras representativo.

Transcorrido un período de tempo, o sistema consumiu todo o nitrato achegado, alcanzando uns niveis constantes para este ión. Isto permítenos concluir que o sistema biolóxico se reequilibra a unhas condicións basais, destacando o papel principal que ten o CO<sub>2</sub> como catalizador destes procesos bioxeoquímicos.

Estudáronse tamén os niveis de nitritos e amonio presentes no sistema e observouse que non se alcanzaban niveis cuantificables, o cal nos leva a concluir que estas especies se transforman noutras a través dos procesos descritos no ciclo do nitróxeno, ou ben son absorbidas axiña polas especies vexetais presentes no acuario.

Pódese establecer unha comparativa co papel do CO<sub>2</sub> no efecto invernadoiro que se produce na atmósfera terrestre. O incremento da cantidade de CO<sub>2</sub> na atmósfera está a acelerar os procesos biolóxicos, non obstante é posible que istos procesos non acadasen o seu novo equilibrio. Ao incorporar nutrientes aos diferentes ciclos bioxeoquímicos que se producen sobre a superficie terrestre, o sistema global ten un período de adaptación. Non sabemos aínda como afectará aos sistemas vivos pero tal como vimos no noso pequeno

sistema é posible que todos os ciclos estén interrelacionados. E que ao cabo de certo tempo a actividade biolóxica compense este incremento de nutrientes e o sistema se reequilibre.