



GO-SHIP Repetir Hidrografia Manual de Nutrientes: O Método Preciso e Determinação precisa de dissolvido Nutrientes inorgânicos na água do mar, Usando Análise de Fluxo Contínuo Métodos

Susan Becker^{1*}, Michio Aoyama^{2,3}, E. Malcolm S. Woodward⁴ Stephen , Karel Bakker^{5,6} ,
Coverly⁷, Claire Mahaffey⁸ e Toste Tanhua⁹

OPEN ACCESS

Editado por:

Julietta Hermes,
Sul Africano Ambiental
Rede de Observação (SAEON),
África do Sul

Revisado por:

Ana M. Aguilar Islas,
University of Alaska Fairbanks,
Estados Unidos
Edward Mawji,
Universidade de Southampton,
Reino Unido

* Correspondência:

Susan Becker
sbecker@ucsd.edu

Seção de especialidade:

Este artigo foi submetido a
Ocean Observation,
uma seção da revista
Fronteiras em Ciências Marinhas

Recebido: 09 de julho de 2020

Aceito: 07 de outubro de 2020

Publicado: 30 de outubro de 2020

Citação:

Becker S, Aoyama M,
Woodward EMS, Bakker K,
Coverly S, Mahaffey C e Tanhua T
(2020) GO-SHIP Repetir Hidrografia
Manual de Nutrientes: O Preciso
e determinação precisa
de Nutrientes Inorgânicos Dissolvidos
em Água do Mar, Usando Métodos de
Análise de Fluxo Contínuo.
Frente. Mar. Sci. 7:581790.
doi: 10.3389/fmars.2020.581790

¹ Scripps Institution of Oceanography, UC San Diego, San Diego, CA, Estados Unidos,

(RIGC), Agência Japonesa para Ciência e Tecnologia Marinha-Terra (JAMSTEC), Yokosuka, Japão,

Isótopos e Dinâmica Ambiental (CRIED), Universidade de Tsukuba, Tsukuba, Japão,

Plymouth, Reino Unido, ⁵ Departamento de Sistemas Oceânicos, Royal Netherlands Institute for Sea Research (NIOZ), Den

Burg, Holanda, da ⁶ Universidade de Utrecht, Den Burg, Holanda, ⁷ BLTEC Korea Limited., Seul, Coreia do Sul, ⁸ Departamento

Terra, Oceano e Ciências Ecológicas, Escola de Ciências Ambientais, Universidade de Liverpool, Liverpool,

Reino Unido, ⁹ GEOMAR Helmholtz Center for Ocean Research Kiel, Kiel, Alemanha

² Instituto de Pesquisa para Mudança Global

³ Centro de Pesquisa em

⁴ Laboratório Marinho de Plymouth,

O manual de nutrientes GO-SHIP abrange todos os aspectos da análise de nutrientes desde a coleta e armazenamento básico de amostras, especificamente para análise de fluxo contínuo usando um analisador automático, e descreve alguns métodos de nutrientes específicos para Nitrato, Nitrito, Silicato, Fosfato e Amônio que estão em uso por muitos laboratórios que realizam análises no mar e seções repetidas de hidrografia em todo o mundo. O foco está nos analisadores de fluxo segmentados e não nos analisadores de injeção de fluxo. Ele também abrange as melhores práticas de laboratório, incluindo procedimentos de controle de qualidade e garantia de qualidade (QC/QA) para obter os melhores resultados e sugere protocolos para o uso de materiais de referência (RM) e materiais de referência certificados (CRMs).

Palavras-chave: nutrientes, boas práticas, GO-SHIP, metodologia, materiais de referência, hidrografia e traçadores

INTRODUÇÃO

A disponibilidade de macronutrientes inorgânicos {nitrato (NO₃), fosfato (PO₄), ácido silícico [Si(OH)₄] comumente referido como "silicato", amônio (NH₄) e nitrito (NO₂)} nas águas oceânicas superiores freqüentemente limita e regula a quantidade de carbono orgânico fixado pelo fitoplâncton, constituindo assim um mecanismo chave de controle do carbono e da ciclagem biogeoquímica. Existem várias regiões biogeográficas no oceano aberto caracterizadas por diferentes regimes de macronutrientes, limitando permanente ou sazonalmente o crescimento do fitoplâncton (Moore, 2016). Medir com precisão as mudanças temporais nas concentrações de macronutrientes é essencial para restringir a produção biológica líquida e os fluxos de exportação, detectar mudanças nos regimes biogeográficos e monitorar fenômenos de eutrofização. Para o trabalho em mar aberto, uma precisão analítica de 1% deve ser almejada pelo Programa de Investigações Hidrográficas Global Ocean Ship-based (GO-SHIP) (Talley et al., 2016; Sloyan et al., 2019) para permitir a quantificação confiável das tendências decadais no

oceano profundo. A consistência interna dos dados de nutrientes na ordem de 1–3% foi alcançada por meio de procedimentos de controle de qualidade secundário (QC) implementados nos Projetos GLODAP e CARINA (Tanhua et al., 2010).

O Geochemical Ocean Sections Study (GEOSECS) na década de 1970 foi um dos primeiros esforços para fornecer uma pesquisa global de marcadores químicos, isotópicos e radioquímicos nos oceanos do mundo. Desde então, houve inúmeras colaborações internacionais para mapear e estudar diferentes aspectos químicos, físicos e biológicos dos oceanos. Esses programas incluem o Joint Global Ocean Flux Study (JGOFS) no final dos anos 80, o World Ocean Circulation Experiment (WOCE) em meados do final dos anos 90 e os programas globais atuais, incluindo Variabilidade Climática e Previsibilidade (CLIVAR), GEOTRACES e GO -ENVIAR. Além desses grandes esforços internacionais, continua a haver muitos outros programas liderados por laboratórios e países individuais para estudar áreas e processos específicos nos oceanos do mundo, incluindo estações e transectos de séries temporais oceânicas.

Todos esses esforços levaram a grandes estudos de síntese de dados, incluindo dióxido de carbono no Oceano Atlântico (CARINA, Key et al., 2010) Carbono Interior do Oceano Pacífico (PACIFICA, Suzuki et al., 2013), GLODAPv1 (Key et al., 2004) e GLODAPv2 (GLODAPv2; Olsen et al., 2016, 2019). Esses estudos incluem análises de diferentes laboratórios internacionais. É imperativo que os conjuntos de dados produzidos pelos diferentes laboratórios sejam comparáveis, e as diferenças nas concentrações no tempo ou no espaço sejam reais e não artefatos de diferentes métodos, padrões ou instrumentação. Em um esforço para verificar a comparabilidade dos conjuntos de dados de nutrientes, houve uma série de exercícios de comparabilidade interlaboratoriais (Organização das Nações Unidas para a Educação, a Ciência e a Cultura UNESCO, 1965, 1967; Conselho Internacional para a Exploração do Mar [ICES], 1967, 1977; Kirkwood et al., 1991; Aminot e Kirkwood, 1995). Existem soluções padrão de estoque de nutrientes comercialmente disponíveis, por exemplo, OSIL1 e outros programas fornecem soluções padrão de estoque que permitem aos laboratórios validar seus métodos (Topping, 1997). No entanto, há uma necessidade de um material de referência para nutrientes que permitisse aos laboratórios comparar e monitorar de perto a qualidade dos dados.

Houve estudos de comparação interlaboratoriais usando materiais de referência, sendo um dos primeiros MOOS certificado pela National Oceanic and Atmospheric Administration/National Research Council Canada (NOAA/NRC). O Meteorological Research Institute (MRI) no Japão liderou uma série mais recente de comparações interlaboratoriais internacionais em 2003, 2006, 2008 e 2012 (Aoyama, 2006, 2010; Aoyama et al., 2007, 2008). A motivação dos exercícios conduzidos por MRI foi o desenvolvimento de materiais de referência para nutrientes na água do mar (RMNS). Em 2014/2015 e 2017/2018, o Projeto Internacional de Coordenação de Carbono Oceânico (IOCCP) e a Agência Japonesa para Ciência e Tecnologia da Terra Marinha (JAMSTEC) realizaram estudos de comparação interlaboratoriais de CRMs de nutrientes na água do mar.

Esses dois exercícios de intercomparação usaram CRMs como amostras conhecidas em 2014/2015 (Aoyama et al., 2016), ou como amostras desconhecidas

amostras em 2017/2018. A disponibilidade e o uso desses CRMs têm sido fundamentais para melhorar a comparabilidade global dos conjuntos de dados de nutrientes. Esses exercícios recentes foram realizados como parte dos termos de referência do grupo de trabalho nº 147 do International SCOR: Rumo à comparabilidade dos dados globais de nutrientes oceânicos (COMPONUT)2.

Os métodos analíticos e químicos básicos usados para determinar as concentrações de nutrientes inorgânicos na água do mar estão bem estabelecidos. Strickland e Parsons delinearão os métodos manuais em seu livro, "A Practical Handbook of Seawater Analysis" (Strickland e Parsons, 1972). Os métodos químicos foram alterados, otimizados e automatizados ao longo das décadas por inúmeros autores, mas as químicas básicas permanecem as mesmas e são baseadas em reações colorimétricas. A exceção a isso são os métodos mais recentes para determinação de amônia/amônia, que são baseados em fluorometria.

O nitrato é determinado usando um procedimento descrito por Armstrong et al. (1967), que envolve a passagem de uma amostra de água do mar por uma coluna de redução de cobre-cádmio onde o nitrato é reduzido a nitrito. O nitrito é então diazotizado com sulfanilamida e acoplado com dicloridrato de N-1-naftil-etilenodiamina (N-1-N/NEDD) para formar um corante azo vermelho, e a absorbância é medida entre 520 e 540 nm.

O fosfato é determinado pela adição de molibdato de amônio acidificado à amostra de água do mar para produzir ácido fosfomolibdico, que é então reduzido a um complexo fosfo-molibdênio azul após a adição de sulfato de dihidrazina (Bernhardt e Wilhelms, 1967) ou ácido ascórbico (Murphy e Riley, 1962), que foi otimizado por Zhang et al. (1999). A absorbância é medida entre 850 e 880 nm.

O silicato é analisado de acordo com dois métodos. O esboço do método em Armstrong et al. (1967) produz um ácido silicomolibdico com a adição de molibdato de amônio. Um complexo de silício-molibdênio é então formado após a adição de cloreto estano, e a absorbância é medida em aproximadamente 660 nm. Alternativamente, o método publicado em Grasshoff et al. (1983) usa ácido ascórbico para reduzir o ácido silicomolibdico ao complexo azul, e a absorbância é medida em aproximadamente 820 nm.

Existem dois métodos de amônia comumente usados, colorimétrico e fluorométrico. O método colorimétrico usa a reação de Berthelot e envolve a reação de hipoclorito e fenol com amônio em uma solução alcalina para formar um composto azul de indofenol. A absorbância da amostra é medida em aproximadamente 660 nm. Este método é uma modificação do procedimento em Grasshoff et al. (1983). O método fluorométrico altamente sensível usando difusão de amônia através de uma membrana de teflon com detecção fluorométrica (Jones, 1991) foi desenvolvido, mas a obtenção da membrana provou ser difícil.

Uma técnica simplificada usando fluorometria, mas sem o uso de membrana, foi publicada por Holmes et al. (1999), que foi adaptado de Kerouel e Aminot (1997). Neste método, a amostra de água do mar é combinada com um reagente de trabalho contendo orto-ftaldialdeído (OPA), sulfito de sódio e tampão de borato e aquecida a 75°C. Fluorescência proporcional ao

1<http://osil.com/>

2http://www.scor-int.org/SCOR_WGs_WG147.htm

a concentração de amônio é medida a partir da emissão a 460 nm após a medição da excitação a 370 nm.

Os laboratórios começaram a usar CFAs e auto-analisadores (AA) em meados da década de 1970. As duas principais formas de CFA são injeção de fluxo (FIA) e analisadores de fluxo segmentado por gás. Enquanto alguns laboratórios atualmente usam FIA para análise de nutrientes, a maioria dos laboratórios globais que realizam análises “no mar” usam analisadores de fluxo segmentado por gás. Este manual se concentra principalmente nos métodos para os analisadores de fluxo segmentado por gás.

O capítulo sobre análise de nutrientes usando análise de fluxo segmentado por Aminot et al. (2009) em “Diretrizes Práticas para a Análise da Água do Mar” fornece um excelente histórico sobre análise de fluxo contínuo. Recomendamos que o leitor também revise este documento, pois contém informações úteis sobre os aspectos técnicos do(s) instrumento(s), a medição de nutrientes, bem como detalhes sobre fontes de erro e contaminação. Há também um manual anterior do GO-SHIP de Hydes et al. (2010) que pode ser referenciado.

COLETA E ARMAZENAMENTO DE AMOSTRAS

Coleta de Amostras A seção

Visão Geral de Aquisição de Dados do manual GO-SHIP (Swift, 2010) deve ser revisada para obter detalhes sobre as práticas de amostragem de garrafas Rosette/Niskin. As amostras de nutrientes devem ser coletadas dos frascos de Roseta/Niskin de Profundidade de Temperatura de Condutividade (CTD) imediatamente após a coleta de amostras para gases dissolvidos. Isso pode ser desafiador se amostras de propriedades orgânicas ou materiais biologicamente sensíveis também estiverem sendo coletadas. Idealmente, as amostras são coletadas em recipientes novos e estéreis de plástico [polietileno de alta densidade (HDPE) ou polipropileno (PP)] que se encaixam diretamente no amostrador automático AA ou subamostrados em recipientes menores. Os recipientes de amostras podem ser reutilizados se os procedimentos de limpeza adequados forem seguidos entre as estações. O uso de um novo recipiente de amostra pode produzir uma quantidade enorme de resíduos plásticos, especialmente nos longos cruzeiros de pesquisa de hidrografia e esses impactos ambientais devem ser considerados.

Para análise de nutrientes em concentrações micromolares (μM), é suficiente enxaguar os recipientes de amostra com água ultrapura (água destilada desionizada ou de sistemas disponíveis comercialmente) seguido de uma lavagem com ácido clorídrico a 10% (HCl, 1,2 M). Isso interrompe qualquer crescimento biológico nos frascos de amostra. Estes devem ser bem enxaguados com água ultrapura antes da coleta do próximo conjunto de amostras. Recipientes de amostra de vidro não devem ser usados ao medir silicato. Se as concentrações nanomolares de nutrientes estiverem sendo medidas, outros procedimentos de limpeza e coleta de amostras podem ser necessários (consulte Becker et al., 2019).

Ao coletar as amostras de água do mar dos frascos CTD/roseta, enxágue os recipientes de amostras e as tampas limpas três vezes antes de enchê-los. Evite tocar nas torneiras de amostragem nos frascos CTD e tome cuidado para enxaguar as torneiras, bem como os recipientes de amostras de nutrientes. As amostras podem ser coletadas com o uso de um Tygon ou tubo de amostragem de silício. Se for usado um tubo de amostragem, enxágue-o bem antes de sair para a roseta para coletar uma série de amostras e certifique-se de enxaguar-lo com cada amostra de água do mar antes de coletar a amostra. Depois de enxaguado, encha a amostra

recipientes com dois terços cheios e tampe imediatamente. As amostras devem ser analisadas depois de atingirem a temperatura ambiente do laboratório. Se a análise for adiada por mais de algumas horas (>2), armazene as amostras em um local escuro e fresco, por exemplo, em uma geladeira; no entanto, as amostras devem retornar à temperatura ambiente antes da análise. Entre os eventos de amostragem CTD, é importante limpar todos os tubos de amostragem com água deionizada limpa e 10% de HCl.

NB A fumaça do cigarro pode contaminar as amostras, principalmente para amônia e nitrato/nitrito, por isso é imperativo que o fumo seja proibido próximo à área onde as amostras são coletadas.

Da mesma forma, as pessoas que fumaram recentemente devem ficar longe de qualquer amostra aberta.

Filtragem e luvas Alguns

laboratórios filtram amostras de nutrientes, enquanto muitos outros laboratórios não o fazem. Em geral, a filtragem não é necessária para amostras coletadas no (sub) oceano aberto tropical, onde a carga de partículas é baixa nesses ambientes oligotróficos. A decisão de filtrar ou não depende da carga de partículas na água que está sendo amostrada. Por exemplo, amostras de perto da costa ou de ambientes produtivos podem exigir filtragem. Nestes casos, muito cuidado deve ser tomado para não contaminar as amostras durante o processo de manipulação e filtragem das amostras. Os tubos de coleta de amostras, os porta-filtros e os filtros devem ser limpos e bem enxaguados com HCl a 10% e água ultrapura antes da coleta de amostras. Os tipos de filtros usados para filtrar a água do mar incluem acetato de celulose, membrana hidrofílica de polipropileno Gelman e filtros de seringa Acrodisc (PALL). Filtros de fibra de vidro (GFF) (contaminação de silicato) ou filtros de nitrato de celulose (contaminação de nitrato) NÃO devem ser usados. O tamanho do filtro é outra consideração, um filtro com tamanho de poro de $0,45 \mu\text{m}$ é comumente usado e, no passado, esse era considerado o tamanho de filtro ideal para remover a maioria das partículas. No entanto, novos insights de microscopia e genômica determinaram que um filtro de $0,45 \mu\text{m}$ não captura todas as bactérias e fitoplâncton. Um filtro de $0,2 \mu\text{m}$ é agora o tamanho recomendado do filtro, e a gravidade, baixa pressão ou filtração a vácuo baixo é recomendada para evitar a ruptura da célula e a contaminação da amostra.

É imprescindível que sejam realizados testes para verificar se o método de filtragem, o tipo de filtro e o tamanho do filtro não levam à contaminação das amostras. Outra técnica simples para minimizar as interferências de partículas é centrifugar as amostras antes da análise. Neste caso, recomenda-se que a amostra seja colocada diretamente no amostrador, garantindo que a altura da sonda de amostra seja tal que não extraia nenhum sedimento que agora está no fundo.

As luvas são outra fonte de contaminação potencial. Nem luvas de neoprene nem de nitrilo colorido devem ser usadas para a amostragem de nutrientes; eles são uma alta fonte de contaminação especialmente para nitrato, nitrito e amônio. Se for tomado cuidado, uma amostra limpa pode ser coletada com as mãos nuas sem o uso de luvas, no entanto, luvas de vinil sem pó são altamente recomendadas para uso em laboratório e para coleta de amostras no mar.

Em geral, é uma boa prática usar luvas ao coletar amostras de água e apenas cientistas experientes que confiam em suas técnicas devem considerar a amostragem sem luvas.

Da mesma forma, é importante que qualquer procedimento de amostragem (como amostragem de gás) seja realizado antes da amostragem de nutrientes

das garrafas CTD, esses cientistas também devem usar luvas não contaminantes de nutrientes (por exemplo, vinil sem pó).

Preservação de amostras A melhor

prática é analisar as amostras de nutrientes no mar, logo após serem coletadas; no entanto, muitas vezes há casos em que a análise de nutrientes no mar não é possível ou é atrasada por vários motivos. Se a análise for adiada por mais de 24 horas, as amostras devem ser preservadas. Existem muitos tipos diferentes de métodos de preservação, incluindo envenenamento, acidificação, pasteurização (Daniel et al., 2012) e congelamento. Não recomendamos acidificação (amostras terão que ser neutralizadas antes da análise) ou envenenamento de amostras com cloreto de mercúrio (risco ambiental). O congelamento é o método mais comumente utilizado, e existem estudos que mostram que o congelamento pode ser um método confiável de preservação de amostras (Aminot e Kerouel, 1995; Dore et al., 1996), sendo este o procedimento recomendado.

Ao congelar amostras, é imperativo que haja espaço livre suficiente nas garrafas para permitir a expansão da água do mar.

Congele as amostras na vertical e verifique se as tampas estão apertadas antes e depois do congelamento das amostras. Não congele amostras em um freezer que tenha material orgânico (amostras de peixe ou alimentos) armazenado nele. Analise as amostras congeladas o mais rápido possível após retornar ao laboratório.

Ainda há debate na comunidade de nutrientes sobre os efeitos do congelamento de amostras na exatidão e precisão da concentração de nutrientes, especialmente para silicato. É bem conhecido que a sílica reativa polimeriza quando congelada, especialmente em altas concentrações (Burton et al., 1970; MacDonald e McLaughlin, 1982; MacDonald et al., 1986). Variáveis que afetam a recuperação de sílica de amostras congeladas incluem salinidade, turbidez, tamanho da garrafa e concentração de silicato. Grande parte do debate atual se concentra nas técnicas de descongelamento recomendadas para despolimerizar a sílica reativa e obter a recuperação completa. Muitos laboratórios têm realizado estudos de técnicas de descongelamento para recuperação de sílica, mas há poucas referências publicadas. Sakamoto et al. (1990) recomendam que as amostras sejam descongeladas durante a noite, no escuro, à temperatura ambiente, ou descongeladas em banho-maria por 30 minutos (50°C) e depois resfriadas à temperatura ambiente antes da análise real. No entanto, Zhang e Ortner (1998) sugeriram que poderia levar até 4 dias para descongelar as amostras à temperatura ambiente para obter a recuperação completa da sílica. Becker et al., 2019 mostram resultados experimentais de estudos recentes realizados no NIOZ e no Scripps Institution of Oceanography (SIO). Os testes realizados no SIO confirmam a recomendação de 1990 de Sakamoto de descongelar as amostras congeladas em banho-maria a 50°C por 30 a 45 minutos e depois permitir que as amostras voltem à temperatura ambiente antes da análise. Mais testes sistemáticos são necessários para determinar os efeitos do armazenamento a longo prazo nas concentrações individuais de nutrientes, bem como as melhores técnicas de descongelamento para vários tipos de amostras (costeiras, estuarinas, oligotróficas, etc.).

INSTRUMENTAÇÃO

Aminot et al. (2009) fornecem uma descrição detalhada dos componentes específicos do AA, incluindo problemas potenciais de

análise. A maioria dos laboratórios marítimos atualmente usa SEAL, Skalar, Alpkem ou sistemas analíticos semelhantes. Os usuários devem consultar os manuais do fabricante para obter informações específicas sobre métodos, operação e manutenção. Um autoanalisador de nutrientes de qualquer fabricante consistirá nos mesmos componentes básicos listados e descritos aqui.

Amostrador

O amostrador deve ser robusto e capaz de lidar com copos de amostra de tamanhos diferentes e um número “razoável” de amostras (entre 24 e 36 amostras, que geralmente é uma estação de amostragem CTD), além de ter uma lavagem da qual a água é continuamente renovada. Uma sonda não metálica ou de platina deve ser usada, e o diâmetro interno da sonda normalmente não deve ser maior do que o maior tubo da bomba de amostragem. Ter um amostrador modificado para aceitar os frascos que foram usados para amostrar diretamente da roseta CTD eliminará possíveis problemas de contaminação ao decantar uma amostra em outro recipiente de amostragem.

Bomba

A bomba peristáltica de velocidade contínua com a tubulação da bomba instalada fornece a amostra/água de linha de base e os reagentes aos coletores para cada canal/química e por todo o sistema AA. Para medições precisas em baixas concentrações, um padrão de bolha regular e uma linha de base estável são absolutamente essenciais, e essa é uma área extremamente importante para obter a correção correta para boas análises.

A composição e a qualidade dos tubos da bomba podem variar entre os fabricantes e de lote para lote. O desgaste do tubo também afetará a taxa de fluxo e a sensibilidade do método, motivo pelo qual um conjunto completo de padrões deve ser executado com cada estação/conjunto de amostras. A substituição dos tubos da bomba de um método pode melhorar a sensibilidade e as características do fluxo de bolhas. Geralmente, os tubos da bomba devem ser trocados regularmente, pois a entrega correta da amostra, e particularmente para alguns reagentes sendo bombeados através de alguns dos tubos de bomba de diâmetro menor (por exemplo, laranja/verde ou laranja/amarelo), ficará muito menos preciso à medida que os tubos se desgastam. Para um desempenho ideal, a troca dos tubos após 50–60 h (dependendo do material e do fabricante dos tubos da bomba em uso) garantirá que o fornecimento de líquido permaneça confiável. Os novos tubos de bomba sem ftalato agora disponíveis comercialmente têm uma vida útil muito reduzida em comparação com os tubos Tygon originais. Não é uma boa prática operar os tubos da bomba até o fim de sua vida útil. Os resultados analíticos não serão tão bons ou confiáveis com tubos antigos quanto com tubos novos, portanto, recomenda-se a troca frequente da tubulação da bomba. Alguns laboratórios fazem uma troca completa de tubos de bomba e reagentes ao mesmo tempo para coordenar o tempo de inatividade da máquina.

Coletor O

coletor consiste em material de vidro e acessórios de injeção e é o local das reações químicas entre as amostras de água do mar e os reagentes. É imperativo que as peças de vidro, as bobinas de reação e os conectores sejam mantidos regularmente para fornecer uma mistura consistente, padrões de fluxo regulares e permitir que as reações atinjam o estado estacionário, o que garante o desenvolvimento total da cor.

A introdução de bolhas de ar ou nitrogênio minimiza o fluxo laminar nas bobinas de vidro e permite a mistura completa entre os segmentos. As bolhas devem ser grandes o suficiente para evitar o transporte e/ou manchas de um segmento para outro, mas se forem muito longas, estarão sujeitas a quebrar no manifold.

A forma da bolha depende se a tubulação que transporta o fluxo segmentado é molhada pelo líquido que passa por ela. As bolhas arredondadas na frente e atrás, em movimento ou estacionárias, indicam que o tubo ou a vidraria está devidamente molhada. As bolhas que aparecem retas na borda traseira ao se mover são uma indicação de que o material de vidro e o tubo não estão devidamente molhados. É muito importante manter um padrão de bolha regular em todo o sistema para reduzir o ruído e otimizar a sensibilidade. Alguns softwares de instrumentos contêm um programa de “verificação de água” que mede e registra a regularidade do padrão de bolhas e expressa o resultado como % de variação.

Para resultados mais consistentes, este valor deve ser inferior a 1%.

É sempre feita referência às bolhas de gás segmentadas como sendo bolhas de “ar”, no entanto, idealmente, essas bolhas de segmentação devem ser nitrogênio ou outro gás inerte para evitar contaminação potencial do ar. Alguns laboratórios têm linhas de gás conectadas diretamente dos cilindros para entregar o gás, mas uma solução mais simples é usar pequenas sacolas plásticas Tedlar (ou similares) que contenham até 5 L de nitrogênio. Estes são particularmente úteis quando se trabalha no mar, pois podem ser facilmente recarregados.

Há muitos fatores a serem considerados ao construir um manifold para garantir fluxo consistente e padrão de bolhas. Abaixo segue uma lista de considerações:

1. Combine o diâmetro interno (ID) da tubulação usada da bomba para os encaixes de injeção e para o material de vidro no manifold o mais próximo possível.
2. Use o menor comprimento possível de tubulação entre as conexões. Longos fluxos não segmentados causam problemas hidráulicos, que se manifestarão de várias maneiras (por exemplo, manchas ou transporte de amostras).
3. Certifique-se de que não haja lacunas/espacos mortos entre as conexões. É importante que todas as juntas de vidro a vidro sejam mantidas juntas por mangas plásticas.
4. Adicione agente umectante suficiente em cada canal analítico para manter as bordas arredondadas na frente e atrás de cada bolha ao longo de todo o fluxo, incluindo o dreno para resíduos.
5. As bolhas de segmentação devem preencher completamente a tubulação por onde passam. O comprimento da bolha em contato com as paredes do tubo deve ser aproximadamente 1,5 vezes o diâmetro do tubo.
6. Mantenha as bobinas de vidro limpas para garantir um fluxo suave da amostra e do fluxo de reagente. O vidro sujo pode fazer com que as bolhas grudem ou quebrem.
7. Limpe os manifolds periodicamente com detergente de laboratório sem fosfato e consulte as recomendações do fabricante. Um alvejante diluído ou solução ácida também pode ser usado para canais de nitrato, nitrito e amônio.

Os canais de silicato e fosfato podem ser limpos com hidróxido de sódio diluído mais etilenodiaminotetracético

solução ácida (EDTA). Muitos problemas analíticos serão evitados com um protocolo de limpeza regular, recomendado após cada conjunto diário de análises.

Os analistas também devem consultar o manual do usuário do fabricante para obter os procedimentos de manutenção recomendados.

8. A linha de resíduos da célula de fluxo segmentada deve abrir para a atmosfera na altura da bancada ou da célula de fluxo.
9. Substitua quaisquer peças de vidro antigas que continuem a fazer com que as bolhas de ar grudem ou quebrem. Tubulação e bobinas de vidro podem ser corroídas pelo ácido e causar formas de pico irregulares.

Detectores Os

detectores consistem em uma fonte de luz [por exemplo, lâmpada, diodo emissor de luz (LED)], célula de fluxo, fotômetro e tubos de entrada e saída (plástico ou vidro). A maioria dos fabricantes oferece a lâmpada tradicional, bem como LED para a fonte de luz. O LED é recomendado para análises realizadas no mar, pois os LEDs são mais estáveis em um navio em movimento e vibração. Assim como no coletor, não deve haver lacunas nas conexões e deve haver um padrão de bolha regular mantido do coletor através da unidade detectora até o desperdício. Dependendo do fabricante, a capacidade de monitorar alterações na saída de luz, voltagem e outras variáveis por meio do software pode estar disponível e deve ser utilizada. No passado, o fluxo da amostra era sempre desbolhado imediatamente antes da amostra entrar nas células de fluxo, mas agora os desenvolvimentos de software de alguns fabricantes permitiram que as bolhas de ar também passassem pelas células, eliminando a necessidade de desbolhar. A capacidade de reter o padrão de bolhas através da célula de fluxo reduz o arraste e o esfregaço de amostra para amostra. Isso, juntamente com o design óptico dos novos fotômetros e células de fluxo, quase eliminou a necessidade de espaços em branco de índice de refração (RIBs) e alguns outros efeitos que interferiram na detecção de pico no passado. Para obter mais detalhes sobre essas correções, consulte a seção “Correções pós-processamento”.

Software O AA

virá instalado com o software do fabricante para controlar todo o sistema, programar o amostrador automático, adquirir a saída de dados brutos dos detectores, exibir a saída em tempo real e realizar algumas correções, calcular valores iniciais de concentração, etc.

Geralmente, existem opções diferentes para o ajuste de calibração a serem usadas nos pacotes de software. Se estiver usando um ajuste linear ou ajuste de ordem superior, a concentração de nutrientes na matriz e os espaços em branco para a matriz e as amostras devem ser cuidadosamente determinados e corrigidos. A maioria dos programas de software corrigirá desvios de transição, linha de base e sensibilidade, mas pode não ter opções para fazer outras correções, como RIBs ou concentrações de matriz diferentes de zero. Consulte o manual do software do seu tipo de analisador para conhecer as especificações do seu instrumento.

Ajustes de calibração e correções em branco são discutidos em mais detalhes em Becker et al., 2019.

MEDIÇÃO E DETERMINAÇÃO DE CONCENTRAÇÕES DE NUTRIENTES

As etapas básicas para análise de amostra estão listadas abaixo e os detalhes são fornecidos nas seções subsequentes:

- (1) a. Estabeleça uma linha de base estável com água ultrapura.
 - b. Estabeleça uma linha de base estável com água ultrapura e reagentes.
 - c. Verifique o branco do reagente (diferença entre água ultrapura e água ultrapura mais reagentes).
- (2) Determinação da curva de calibração a partir de concentrações padrão e alturas de pico medidas.
- (3) Medição das alturas dos picos das amostras.
- (4) Correções para transição, linha de base e desvio de sensibilidade.
- (5) Determinação das concentrações iniciais das amostras com base na curva de calibração e nas alturas dos picos das amostras.
- (6) Aplicação de outras correções, incluindo RIBs, efeito de sal, etc.

Determinações de linha de base

Uma solução de linha de base comum usada em toda a comunidade de análise de nutrientes é a água doce ultrapura. No entanto, em alguns casos, os analistas usam água do mar com baixo teor de nutrientes (LNSW) se tiverem suprimentos abundantes. Alguns laboratórios produzem sua própria água do mar “artificial” (ASW), adicionando sais à água ultrapura. Um exemplo de receita para ASW é 41 g de cloreto de sódio mais 168 mg de bicarbonato de sódio por litro. Aqui discutimos o uso de água ultrapura como água de linha de base, pois é um “zero” confiável e recomendado para nutrientes e pode ser obtido com facilidade e rapidez em um laboratório de pesquisa. Recomenda-se que esses sistemas de água ultrapura recebam manutenção regularmente de acordo com as recomendações do fabricante e que a pureza da água seja verificada, especialmente onde a amostra está sendo analisada.

A determinação da linha de base deve ser direta se os procedimentos corretos forem seguidos. A água ultrapura deve ter pelo menos 18,2 megohm de resistência e estar livre de compostos orgânicos. A esterilização ultravioleta (UV) é preferida, mas não estritamente necessária. A maioria dos sistemas de purificação de água disponíveis comercialmente fornecem água ultrapura aceitável para estabelecer uma linha de base zero.

Deve-se observar que o pote de lavagem no amostrador e o recipiente que alimenta o pote de lavagem podem ficar contaminados.

Recomenda-se que sejam limpos uma vez ao dia por enxágue com solução de HCl a 10% seguido de enxágue com água ultrapura. Alguns fabricantes oferecem um “lavatório móvel”, que é um sistema selado e, portanto, permanece não contaminado e limpo durante as operações diárias, portanto, pode ser uma opção a ser considerada. Em casos raros, é possível que a água ultrapura não seja pura, mesmo que a leitura de resistividade seja de 18,2 megaohm, por exemplo, o silicato pode passar pelo cartucho de filtração, mas não afetará a leitura de megaohm. Pode ser difícil determinar se a água ultrapura não é tão pura quanto o necessário e, portanto, os analistas devem comparar a diferença entre a linha de base ultrapura e a linha de base ultrapura com reagentes diariamente. Outro possível indicador de água de linha de base de baixa qualidade são as leituras negativas de absorvância para amostras com baixas concentrações de nutrientes. Isso poderia

indicar que os cartuchos de filtragem no sistema de água ultrapura precisam ser substituídos.

A linha de base da água é determinada após o instrumento ter funcionado por tempo suficiente com água ultrapura fresca e as linhas de base se tornarem estáveis, e geralmente é recomendado que seja de pelo menos 15 a 20 minutos. Isso também permite verificar se há vazamentos em todo o sistema antes que os reagentes sejam adicionados. Pode ser necessário, em casos raros, adicionar agente umectante à água ultrapura para estabelecer um bom padrão de bolhas e linhas de base estáveis. Assim que a linha de base da água ultrapura estiver estabilizada, os reagentes podem ser adicionados e os reagentes mais a linha de base da água ultrapura determinada.

Muitas vezes é útil adicionar os reagentes um de cada vez para ver se algum deles causa um grande branco de reagente. A linha de base do reagente é a referência para quando a curva padrão é determinada e o cálculo subsequente das concentrações da amostra. É uma boa prática definir um procedimento de configuração regular para o analisador que possa ser seguido todos os dias e todas as execuções. Para minimizar o branco do reagente, devem ser usados produtos químicos de grau analítico (ou melhor) e água fresca ultrapura.

É crucial que as concentrações de nutrientes para LNSW ou ASW sejam calculadas se estiverem sendo usadas como linha de base em vez de água ultrapura. Aoyama et al. (2015) detalhou um procedimento que inclui a análise de um valor conhecido de cada padrão adicionado ao LNSW, seguido de uma linha de base de LNSW com e sem reagente de cor e uma linha de base de água ultrapura com e sem reagente. As diferenças são usadas para calcular a concentração de cada nutriente no LNSW (Becker et al., 2019).

Existem diferentes maneiras de obter LNSW. Uma opção é coletar grandes lotes de água do mar de superfície de águas oligotróficas durante um cruzeiro de pesquisa. Recomenda-se que a água seja filtrada e esterilizada para garantir que os níveis de nutrientes permaneçam baixos, por exemplo, bombeada através de um filtro de 0,45 µm, passando por uma fonte de luz UV e, em seguida, através de um filtro de 0,1 µm e recirculada por aproximadamente 16 h.

Alternativamente, é possível coletar a água do mar de superfície filtrada usando uma amostra de água do mar de superfície filtrada, permitindo que a água do mar envelheça [armazenada em temperatura ambiente por um período de tempo (1–2 anos)] permitindo que as concentrações de nutrientes da água já oligotrófica diminuam. Os garrafões utilizados para armazenar a água do mar devem permitir a penetração da luz (transparente ou opaca).

A água do mar de superfície deve ser filtrada novamente antes do uso, e a água a ser usada sempre analisada como uma amostra para garantir que seja de fato pobre em nutrientes.

Calibração Uma

série de pelo menos quatro padrões de trabalho deve ser analisada com cada conjunto de amostras. As concentrações do padrão devem ser distribuídas uniformemente por toda a faixa de concentração e não inclinadas para nenhuma das extremidades, com o padrão de concentração superior tendo uma concentração ligeiramente maior do que a amostra n. Os padrões geralmente são analisados no início de uma execução analítica com os protocolos configurados no software do analisador. Os padrões de trabalho devem ser preparados frescos pelo menos uma vez por dia, ou a cada 8–12 horas quando o analisador de nutrientes estiver em operação 24 horas por dia, por exemplo, ao trabalhar no mar. Os padrões de trabalho são preparados a partir de padrões primários ou secundários concentrados que são pré-fabricados em água ultrapura (consulte a seção “Preparação e Padronização de Padrões” para preparações de padrões). para o trabalho

curva padrão, os padrões concentrados são diluídos com água de matriz semelhante às amostras. Por exemplo, se estiver trabalhando em uma região oceânica oligotrófica envelhecida LNSW ou água do mar de superfície deve ser usada como matriz padrão. Não é recomendado usar ASW ou água ultrapura como matriz para os padrões de trabalho. A curva padrão deve cobrir toda a gama de concentrações esperadas da amostra. É importante que o LNSW seja usado para as diluições. É altamente recomendável que os padrões e as amostras sejam analisados de baixas a altas concentrações para evitar a contaminação. Uma vez que as alturas dos picos dos padrões tenham sido medidas, a curva de calibração pode ser produzida. O software analítico dos fabricantes de analisadores modernos fornecerá a curva de calibração, mas leia as notas de orientação para obter detalhes. Existem muitos fatores que afetam a calibração (consulte Becker et al., 2019) para obter detalhes sobre como determinar o melhor ajuste de calibração.

Medição de Alturas de Pico de Amostra A maioria dos softwares usa um algoritmo para determinar a altura de pico e colocará automaticamente um marcador de pico onde considera a altura de pico correta. No entanto, os marcadores de pico devem sempre ser verificados pelo analista usando o software do sistema para garantir que o software esteja lendo os picos com precisão e também para corrigir picos e outras anomalias que possam afetar a validade da altura inicial do pico. Consulte o manual do software para obter detalhes sobre como os picos são medidos e como ajustar e salvar as leituras, se necessário.

Correções para qualquer desvio da linha de base, desvio

de sensibilidade e transferência Os cálculos de desvio da linha de base corrigirão qualquer desvio linear entre medições sucessivas da linha de base e devem ser colocados regularmente durante a corrida. O desvio de sensibilidade é medido por qualquer alteração entre as amostras de "desvio", que normalmente são analisadas perto do início e do final da execução, se não com mais frequência. A amostra de desvio deve estar entre 50 e 75% do padrão mais alto. O transporte é baseado nas diferenças de altura de pico entre dois picos baixos sucessivos medidos diretamente após um pico alto.

Determinação das concentrações iniciais das amostras

Ao determinar as concentrações iniciais das amostras, a maioria dos softwares de instrumentos terá a opção de aplicar correções de linha de base, transferência e desvio, e pode fornecer concentrações de amostras corrigidas e não corrigidas. Recomenda-se que os usuários revisem como os cálculos são aplicados para garantir a validade de quaisquer correções pós-execução.

Pode ser necessário enviar os dados brutos para aplicar correções e calcular as concentrações em um pacote de software diferente, por exemplo, Excel.

Correções pós-processamento

Os espaços em branco do índice de refração (RIBs) devem ser determinados separadamente para cada canal e, se necessário, subtraídos ou adicionados ao

concentrações de amostra. O procedimento para determinar esses valores para cada canal envolve a análise de amostras removendo um dos reagentes químicos formadores de cor (Aminot et al., 2009).

Para muitos sistemas, esses valores são geralmente positivos, embora muito pequenos, e devem ser determinados e, em seguida, quaisquer correções aplicadas aos resultados antes que as concentrações da amostra sejam finalizadas. Em métodos fluorométricos, como para amônia, nenhum RIB é produzido.

Detectores e células de fluxo modernos minimizam os efeitos da salinidade na análise de amostras de água do mar com uma lavagem com água ultrapura, e uma correção pode não ser necessária, no entanto, deve ser verificada. O efeito óptico causado pela mistura de duas soluções de densidades diferentes, como água de lavagem ultrapura com uma amostra de água do mar, é chamado de efeito Schlieren. Este efeito é bastante reduzido em analisadores modernos por células de fluxo e detectores que permitem que a bolha entre amostras passe por eles. O uso de um desborbulhador, instalado antes da célula de fluxo em analisadores mais antigos, aumentará o efeito Schlieren, levando a caudas nos picos.

MÉTODOS ANALÍTICOS QUÍMICOS

Métodos analíticos, incluindo receitas de reagentes e configurações de bobina, são fornecidos pelos fabricantes de todos os instrumentos AA. Alguns laboratórios têm métodos analíticos otimizados para seu próprio uso e requisitos específicos e estes são frequentemente transmitidos ao longo de muitos anos por diferentes analistas. Uma razão para otimizar ou alterar os métodos é, por exemplo, permitir maior sensibilidade em concentrações mais baixas de nutrientes, se estiver trabalhando principalmente em águas oligotróficas. Ver Becker et al. (2019) Apêndices F e G para métodos detalhados em uso por alguns laboratórios de referência. Estes são fornecidos apenas como exemplos para permitir a comparação com os próprios métodos e receitas de reagentes dos analistas, mas não são especificamente recomendados.

As químicas dos métodos ficam a cargo dos analistas individuais.

Análise de Nitrato e Nitrito

A maioria dos laboratórios atualmente usa um método analítico onde N-1-N (NEDD) e sulfanilamida reagem com a amostra para formar um corante vermelho, que é medido em uma absorvância de 520–540 nm.

Para análise de nitrato, o nitrato é primeiro reduzido a nitrito pela amostra sendo misturada com uma solução tampão (por exemplo, cloreto de amônio ou imidazol) e passada por uma coluna de cádmio que foi tratada com sulfato de cobre, que catalisa a reação de redução. O nitrito resultante é então analisado e a saída final para o canal "nitrato" é uma soma de nitrato e nitrito. Portanto, é importante analisar o nitrito separadamente para que o nitrato possa ser determinado subtraindo da concentração total de nitrato mais nitrito.

A eficiência de redução da coluna de cádmio também deve ser determinada e monitorada ao longo do tempo. Essa eficiência é medida pela análise de duas amostras separadas, uma para nitrato e outra para nitrito, cada uma com a mesma alta concentração (por exemplo, 25 µM). A diferença nas concentrações medidas permitirá ao analista calcular a eficiência de redução da coluna. Se a eficiência de redução da coluna for inferior a 95%, a coluna de cádmio deve ser recondicionada ou substituída.

comunidade está recomendando a redução do uso de materiais tóxicos e/ou venenosos.

Sais primários de grau padrão para fosfato (dihidrogenofosfato de potássio anidro, KH_2PO_4), nitrato (nitrato de potássio, KNO_3) e nitrito (nitrito de sódio, NaNO_2) estão disponíveis com pureza de 99,995% ou superior. Nenhuma correção de pureza é necessária se sais desta qualidade forem usados ao preparar padrões primários. Os padrões de silicato são feitos com hexafluorosilicato de sódio de grau analítico ou a partir de uma solução padrão de silicato (SiO_2). Os padrões de amônio são feitos com sulfato de amônio de grau analítico [$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$], que está disponível com uma pureza de > 99,0%. A pureza do sal ou solução usada para os padrões primários nesses casos deve ser ajustada conforme apropriado e claramente indicada na documentação. Deve-se tomar cuidado para neutralizar a solução padrão de sílica se for fornecida pelo fabricante em hidróxido de sódio diluído.

Os sais padrão devem ser secos por 2 a 4 horas a 105°C e resfriados à temperatura ambiente em um dessecador antes da pesagem. Os sais padrão primários devem ser pesados com uma precisão de 0,1 mg e depois dissolvidos em água ultrapura. A temperatura da solução deve ser registrada e devem ser usados frascos volumétricos de vidro classe A calibrados.

Ajuste o peso do sal para a flutuabilidade do ar ao determinar a concentração final exata das soluções padrão primárias (consulte Becker et al., 2019 para obter detalhes completos).

Os seguintes são exemplos de preparações de padrão primário e são fornecidos aqui apenas como um guia. Você deve registrar a temperatura das soluções finais e calcular a concentração do padrão primário usando o volume do balão volumétrico, a temperatura e a massa real de sal. Cada solução deve ser transferida para um frasco de HDPE limpo e seco e armazenada pronta para uso.

Os padrões de silicato nunca devem ser armazenados em vidro.

Padrão de nitrato (aproximadamente $15.000 \mu\text{mol/L}$): Em um balão volumétrico classe A calibrado de 1 L, dissolva $1,5\text{xxx g}$ de nitrato de potássio seco de alta pureza em água ultrapura para fazer uma solução de volume final de 1 L.

Padrão de nitrito (aproximadamente $5.000 \mu\text{mol/L}$): Em um balão volumétrico classe A calibrado de 1 L, dissolva $0,34\text{xx g}$ de nitrito de sódio seco de alta pureza em água ultrapura para fazer uma solução de volume final de 1 L.

Padrão de fosfato (aproximadamente $6.000 \mu\text{mol/L}$): Em um balão volumétrico classe A calibrado de 1 L, dissolva $0,81\text{xx g}$ de fosfato de potássio seco de alta pureza em água ultrapura para fazer uma solução de volume final de 1 L.

Padrão de amônio (aproximadamente $4.000 \mu\text{mol/L}$): Em um balão volumétrico classe A calibrado de 1 L, dissolva $0,26\text{xx g}$ de sulfato de amônio seco de alta pureza em água ultrapura para uma solução de volume final de 1 L.

Padrão de Silicato ($10.000 \mu\text{mol/L}$): Em um balão volumétrico de plástico HDPE de 1 L, dissolva $1,88\text{xx g}$ de fluorsilicato de sódio em cerca de 400 ml de água ultrapura. Isso levará um mínimo de 5 h para dissolver usando ultra-som,

ou por agitação. Completar a solução dissolvida até 1 L com água ultrapura.

Um padrão alternativo de silicato líquido está disponível comercialmente no Instituto Nacional de Padrões e Tecnologia (NIST): Adicione 40 ml de uma solução de 1 g Si/

kg a 500 ml de água ultrapura para uma concentração de $2.860 \mu\text{mol/L}$. Para neutralizar a solução, adicione $2,9979 \text{ ml}$ de HCl 1N antes de diluir a solução para 500 ml.

Padrões Secundários (Sub-Primários) Dependendo das concentrações desejadas para os padrões de trabalho finais, podem ser preparados padrões de nutrientes separados ou um padrão secundário misto diluindo os padrões primários com água ultrapura. As soluções padrão secundárias podem ser preparadas diariamente ou na mesma frequência que os padrões primários. O padrão secundário para nitrito e amônio deve ser elaborado sempre que houver necessidade de um conjunto de padrões de trabalho, ou seja: a cada corrida analítica.

A concentração final dos padrões secundários deve levar em consideração as calibrações de vidraria e pipetas (ver Becker et al., 2019).

Padrões de trabalho Os

padrões de trabalho são feitos na mesma água de salinidade que as amostras. LNSW é a matriz recomendada para criar soluções padrão de trabalho. Estes são preparados a partir das soluções secundárias ou primárias, dependendo de quais são as concentrações finais desejadas. Pelo menos quatro concentrações diferentes de padrões de trabalho devem ser analisadas com cada conjunto de amostras.

CONTROLE DE QUALIDADE E QUALIDADE AVALIAÇÃO (QC/QA)

Definições e determinação Os procedimentos de controle de qualidade e a avaliação da qualidade dos dados fornecem um meio para determinar a exatidão e a precisão das medições.

As definições são fornecidas, pois é importante que o analista entenda a diferença entre controle de qualidade, avaliação de qualidade, exatidão e precisão. Estes são retirados do Capítulo 3 do "Guia de Melhores Práticas para Medição de CO_2 Oceânico" (Dickson et al., 2007):

Controle de qualidade—O sistema geral de atividades cuja finalidade é controlar a qualidade de uma medição de modo que ela atenda às necessidades dos usuários. O objetivo é garantir que os dados gerados sejam de precisão conhecida em algum grau quantitativo declarado de probabilidade e, assim, forneçam qualidade satisfatória, confiável e econômica.

Avaliação de qualidade—O sistema geral de atividades cujo objetivo é fornecer garantia de que o controle de qualidade está sendo feito de forma eficaz. Ele fornece uma avaliação contínua da qualidade das análises e do desempenho do sistema analítico.

Precisão - é uma medida de quão reprodutível é um determinado procedimento experimental. Pode referir-se a um determinado

estágio do procedimento, por exemplo, a análise final, ou para todo o procedimento, incluindo amostragem e manuseio da amostra. É estimado realizando medições replicadas e estimando uma média e um desvio padrão dos resultados obtidos.

A precisão, no entanto, é uma medida do grau de concordância de um valor medido com o valor “verdadeiro”. Um método preciso fornece resultados imparciais. É uma quantidade muito mais difícil de estimar e só pode ser inferida por meio de atenção cuidadosa a possíveis fontes de erro sistemático.

Procedimentos Operacionais Padrão (POPs)

O controle de qualidade começa com a configuração do instrumento e atenção aos detalhes descritos nas seções “Manifold” referentes à montagem dos manifolds e procedimentos de manutenção. Uma vez que o instrumento esteja configurado e funcionando, um conjunto de POPs deve ser implementado e sempre seguido para a análise de amostras.

Os POPs devem incluir:

- Calibração de vidrarias e pipetas. • Determinação cuidadosa de padrões e ajustes de calibração. •

Verificações diárias no sistema, incluindo inspeção visual dos padrões de bolhas, rastreamento da linha de base com e sem reagentes e uma amostra de teste (geralmente um padrão alto) para garantir que tudo esteja funcionando corretamente e com as mesmas configurações e sensibilidades obtidas anteriormente para isso amostra de teste. Esta é uma boa medida de controle de qualidade padrão. Ao usar a mesma concentração de amostra de teste, as configurações de sensibilidade (ganho) do analisador devem permanecer as mesmas, mesmo após a troca de reagentes ou tubos de bomba. Se a sensibilidade mudar, é uma indicação precoce de que há um problema que precisa ser investigado, provavelmente associado a quaisquer alterações feitas (por exemplo, um reagente foi preparado incorretamente ou tubos de bomba incorretos substituídos, etc.).

- Um protocolo de bandeja estabelecido no software deve ser usado, veja o exemplo na **Figura 1** abaixo. Isso é para garantir que padrões, amostras e outros picos sejam incluídos e executados na mesma ordem para cada análise e para cada execução. Pode incluir correções de transferência, desvio, linha de base e outras.

Verificações internas As

verificações internas devem ser usadas para garantir a qualidade dos dados ao longo de um cruzeiro. Diferentes tipos de verificações internas incluem análise de amostra duplicada, uso de uma amostra de verificação (veja abaixo) e análise de um padrão interno em cada execução. A análise de amostra duplicada deve ser realizada em execuções de análise de amostra separadas. O desvio da análise de amostra duplicada entre as execuções geralmente será maior e produzirá uma medida mais precisa da qualidade dos dados entre as execuções e ao longo de um cruzeiro.

O desvio entre as execuções pode ser reduzido usando uma “amostra de verificação” ou “padrão de rastreamento” e normalizando os dados de execução e amostras para esses valores.

Amostra de verificação (rastreamento)

Uma opção para obter uma amostra de verificação é coletar águas profundas (aproximadamente 1.000 m) de um dos primeiros moldes CTD de cruzeiro.

A água deve ter valores razoavelmente altos (mas dentro da escala) para todos os nutrientes. Esta deve então ser envenenada com uma solução saturada de cloreto de mercúrio (1 mL por 10 L) e, em seguida, alíquotas desta amostra analisadas a cada corrida analítica. Neste caso, o cloreto de mercúrio é o meio mais eficaz para preservar a amostra e é recomendado apesar dos esforços para buscar alternativas ao veneno. A execução de uma amostra envenenada a cada execução não afetará a eficiência da coluna de redução de cádmio nem interferirá nas outras químicas. Acompanhar o valor dessa amostra ao longo do tempo pode ajudar a alertar o operador sobre quaisquer problemas com os produtos químicos e o desempenho do analisador. Uma tabela deve ser compilada para o relatório de cruzeiro, mostrando o valor médio e o desvio padrão para cada canal analítico. Conforme mencionado, os dados de amostra para uma execução específica podem ser normalizados se o valor dessa amostra estiver fora da precisão desejada. Os valores de execução individual devem estar dentro de 1% do valor médio geral do cruzeiro.

O uso de um padrão interno foi desenvolvido no NIOZ. Seu procedimento exige a preparação de uma quantidade suficiente de padrão de nutrientes concentrado misturado em água ultrapura, que é então preservada pela adição de cloreto de mercúrio. Ele é preparado independentemente dos padrões primários e de trabalho usados para calibrar as execuções de análise individuais. Essa solução de rastreamento é então diluída em LNSW e medida como parte de cada execução de análise. A solução de rastreamento é preparada por uma diluição de uma etapa, o que significa que a reprodutibilidade deve ser de cerca de 0,1% e variações apenas devido aos erros de pipetagem inerentes. No final do cruzeiro, um valor médio para a solução de rastreamento ou a amostra de verificação é calculado e os dados para cada execução de análise podem ser normalizados para esse valor médio calculando e aplicando um fator em cada execução. A NIOZ tem usado com sucesso esses protocolos internos padrão por mais de 20 anos (Hoppema et al., 2015). Observe que o uso dessa solução de rastreamento só é válido se seu valor estiver na mesma faixa das amostras sendo analisadas e em uma faixa de cerca de 60 a 80% dos valores de escala completa.

A solução de rastreamento ou amostra de verificação deve ser analisada pelo menos três vezes em uma execução de análise para monitorar o desempenho em cada execução, bem como entre as execuções e ao longo do cruzeiro. Essas verificações internas podem ser usadas para normalizar os dados para cada conjunto de amostras. No final do cruzeiro é calculado um valor médio para a verificação interna. Os dados para cada execução são então normalizados pela razão do valor da amostra de verificação interna para aquela execução em relação ao valor médio de todo o cruzeiro. Deve-se notar que esta é uma verificação de qualidade interna e não substitui o uso de CRMs.

Verificações externas de qualidade As

verificações externas ajudam a avaliar a comparabilidade dos dados de diferentes cruzeiros e diferentes laboratórios. A participação em exercícios nacionais ou internacionais de intercomparação (intercalibração) é um exemplo de verificação externa e é fortemente recomendada. Outra verificação externa recomendada é incluir a análise de CRMs ou RMs, dentro de uma execução analítica.

Os materiais de referência são amostras de água do mar preservadas com concentrações de nutrientes bem definidas. Os materiais de referência certificados também têm concentrações bem definidas, mas os valores foram verificados por comparação com uma solução padrão conhecida que

Peak	Icon	Type	Cup	Sample ID
1	Primer	P	1	Primer
2	H1	H1	1	High
3	L1	L1	0	Low
4	L1	L1	0	Low
5	CC	CC	3	sw
6	CC	CC	3	sw
7	CC	CC	4	std1
8	CC	CC	4	std1
9	CC	CC	5	std2
10	CC	CC	5	std2
11	CC	CC	6	std3
12	CC	CC	6	std3
13	D	D	2	Drift
14	B	B	0	Baseline
15	S	S	7	136
16	S	S	8	135
17	S	S	9	134
18	S	S	10	133
19	S	S	11	132
20	S	S	12	131
21	S	S	13	130
22	S	S	14	129
23	S	S	15	128
24	S	S	16	127
25	S	S	17	126
--	--	--	--	--

FIGURA 1 | Um exemplo de um arquivo de bandeja, neste caso do software AACE usado com o analisador SEAL AA3. Observe também os quatro níveis de concentração padrão usados em cada execução, conforme explicado na seção "Calibração".

é rastreável ao Sistema Internacional de Unidades (SI) ou foi determinado por um método independente de análise. Os valores certificados para a maioria dos CRMs de nutrientes são estabelecidos usando soluções padrão rastreáveis. Recomenda-se que os CRMs sejam usados sobre os RMs, se disponíveis. O analista deve estar ciente de como os valores dos materiais foram determinados e verificados. Ambos RMs e CRMs são usados para garantir a consistência das medições dentro de um cruzeiro (ou seja, estação para estação; depois que um novo lote de reagentes ou padrões foi preparado, etc.) e entre diferentes cruzeiros, provavelmente executados por diferentes grupos de laboratório. Os CRMs podem ser obtidos em várias concentrações e com várias matrizes de água do mar, representando diferentes condições/salinidades oceânicas. É fortemente recomendado o uso de CRMs de nutrientes para todos os cruzeiros de pesquisa e para análises laboratoriais, especialmente para cruzeiros onde dados de alta qualidade e precisão são necessários, como para os programas de repetição de hidrografia GO-SHIP (CLIVAR) e GEOTRACES.

A KANSO Technos desenvolveu inicialmente materiais de referência de nutrientes e, nos últimos anos, produziu os materiais de referência de nutrientes certificados. O grupo de trabalho SCOR Nutrient nº 147 (ver nota de rodapé) em associação com JAMSTEC, produziu recentemente uma série de 5 conjuntos de CRMs de nutrientes, com 2 soluções de faixa de concentração do Pacífico e 3 do Atlântico. Eles são vendidos sem fins lucrativos para beneficiar a comunidade global de nutrientes e incentivar um uso mais amplo de CRMs de nutrientes. Eles estão disponíveis para compra através do JAMSTEC3 e foram produzidos para tornar o uso dos CRMs mais barato e, portanto, mais acessível a um número maior de laboratórios globais. Estes vêm em recipientes de PP de 100 ml e selados em um saco de alumínio hermético. Os CRMs devem ser abertos e transferidos para tubos de amostra limpos e analisados a cada corrida, ou pelo menos uma vez por dia. O

[3https://www.jamstec.go.jp/scor/](https://www.jamstec.go.jp/scor/)

os valores analíticos de nutrientes devem ser rastreados para que quaisquer valores que se desviem das concentrações certificadas declaradas sejam anotados e investigados. Existem outros materiais de referência disponíveis, por exemplo, do Instituto Coreano de Ciência e Tecnologia Oceânica (KIOST), MOOS-3 (NRC Canadá) e Eurofins Scientific.

Os valores certificados de SCOR-JAMSTEC CRMs e KANSO CRMs são rastreáveis ao Sistema Internacional de Unidades (SI). Soluções padrão com incertezas declaradas do Sistema de Serviço de Calibração do Japão (JCSS) do Instituto de Avaliação e Pesquisa de Produtos Químicos (CERI) e do Instituto Nacional de Metrologia do Japão (NMIJ) são usadas para certificar os valores de nitrato, nitrito e fosfato. Uma solução padrão de silício produzida pela Merck KGaA e uma solução padrão de silício (SRM3150) do Instituto Nacional de Padrões e Tecnologia (NIST) são usadas para certificar os valores de silicato. Cada solução tem um valor de incerteza declarado.

Como usar CRMs/RMs Os CRMs devem

ser executados como uma amostra dentro de cada execução analítica, semelhante à amostra de verificação interna ou padrão de rastreamento descrito acima. Um CRM ou RM deve ser executado pelo menos uma vez por dia e, idealmente, uma nova garrafa de (C)RM deve ser aberta para cada nova execução. Um uso menos desejável dos CRMs é utilizar vários lotes como padrões de trabalho para cada corrida analítica. Novos frascos devem ser abertos para cada execução, mas isso seria proibitivamente caro para a maioria dos laboratórios. Os laboratórios do SIO e do NIOZ descobriram que um frasco (C)RM previamente aberto pode ser usado por 1 a 2 dias. Deve-se tomar cuidado para que os frascos de (C)RM abertos não sejam contaminados e devem ser armazenados bem fechados à temperatura ambiente para garantir que a concentração de nutrientes permaneça inalterada.

Uma tabela deve ser incluída no relatório de cruzeiro mostrando os valores verdadeiros ou atribuídos dos CRMs, o valor médio dos CRMs determinados durante o cruzeiro e os desvios padrão para cada canal analítico. Idealmente, os valores obtidos para os MRCs estariam de acordo com o valor atribuído e assim os dados não precisariam ser normalizados.

Se o(s) valor(es) para os materiais de referência obtidos nas execuções de análise não concordarem com o valor atribuído, isso deve ser anotado. Ainda há debate sobre o melhor método de normalizar os dados para o valor do CRM. Se o uso recomendado do CRM (analisado como desconhecido a cada execução) for seguido, o conjunto de dados precisará ser normalizado para o valor verdadeiro ou atribuído do material. Os analistas que executam as amostras são os mais informados sobre as condições analíticas e qualquer normalização realizada no(s) conjunto(s) de dados, com base no uso de CRMs, deve ser realizada por esse analista. É imperativo que qualquer normalização feita seja bem documentada. Devem ser informados os valores originais dos CRMs, bem como os valores normalizados obtidos. Detalhes sobre como os ajustes foram realizados devem ser incluídos no relatório de metadados do cruzeiro.

Se os CRMs ou RMs estiverem sendo usados para padronização, o efeito é que o conjunto de dados é normalizado para os valores do material usado. Isso deve ser específico e claramente descrito nos metadados e no relatório do cruzeiro.

Os analistas devem estar cientes de que alguns valores atribuídos ao CRM são relatados em $\mu\text{mol/kg}$ e as concentrações iniciais de amostras de nutrientes de AAs são calculadas em $\mu\text{mol/L}$. Isso é

importante garantir que quaisquer normalizações realizadas nos dados sejam baseadas nos valores atribuídos pelo CRM e estejam nas mesmas unidades que os dados obtidos na execução analítica.

Avaliação da qualidade dos dados Depois

que as verificações e correções iniciais forem concluídas, as verificações primárias e secundárias da avaliação da qualidade (QA) devem ser realizadas. O controle de qualidade primário é um processo no qual os dados são examinados para identificar valores discrepantes e erros óbvios. Outliers são sinalizados ou os dados atualizados se um erro corrigível puder ser identificado, por exemplo, se um pico de amostra foi mal lido e não identificado ou ajustado quando a execução da análise foi processada. A garantia de qualidade secundária é um processo no qual os dados são revisados objetivamente pelo analista para quantificar vieses sistemáticos nos valores relatados (por exemplo, Tanhua et al., 2010). A maioria dos laboratórios marítimos desenvolveu seus próprios métodos e ferramentas para realizar verificações primárias e secundárias de CQ. No entanto, existem algumas ferramentas de software diferentes que estão disponíveis para download para auxiliar nas comparações de CQ primário e secundário, incluindo: Ocean Data View (Schlitzer, 2020), JavaOcean Atlas (Osborne et al., 2020) e a caixa de ferramentas descrita por Lauvset e Tanhua (2015).

Verificações primárias de

controle de qualidade Os dados de cada canal/química devem ser plotados em função da pressão ou profundidade para elucidar quaisquer anormalidades que possam ocorrer devido ao disparo incorreto do frasco CTD, vazamento ou problemas de contaminação. Esses dados podem ser plotados e comparados com outras propriedades físicas e químicas das amostras analisadas a bordo. Recomenda-se comparar os perfis de nutrientes com os perfis de salinidade, temperatura, oxigênio e carbono inorgânico dissolvido, para ver se características ou exceções são observadas nesses parâmetros também.

Gráficos de nitrato mais nitrito (e amônia, se analisado) versus fosfato e gráficos de silicato versus valores de oxigênio também permitem a identificação de quaisquer valores problemáticos. Isso pode ser feito para cada estação uma vez que todos os dados para os outros parâmetros sendo medidos estejam disponíveis. Os valores das estações simultâneas também devem ser examinados para garantir que quaisquer mudanças nos valores sejam reais e não uma indicação de um problema de sensibilidade, análise ou contaminação.

Verificações secundárias de

controle de qualidade A comparação dos dados atuais com dados oceanográficos históricos para perfis verticais e relações de nutrientes pode ser realizada para detectar vieses sistemáticos. Registros de transectos GO-SHIP (anteriormente CLIVAR) e WOCE cobrindo todos os oceanos globais estão no registro público e podem ser acessados por meio de bancos de dados como o CCHDO⁴, embora seja recomendado usar o produto de dados ajustado ao viés do GLODAP5⁵ se um possível viés nos dados for detectado durante o cruzeiro, esforços devem ser feitos para identificar possíveis problemas no procedimento analítico. A GLODAP recomenda fortemente que nenhuma correção de viés seja aplicada aos dados relatados de um cruzeiro; em vez disso, uma observação deve ser feita nos metadados para possíveis problemas de viés.

⁴ cchdo.ucsd.edu

⁵ <https://www.glodap.info/>

DOCUMENTAÇÃO

Relatórios de cruzeiro

O seguinte deve ser incluído na seção de nutrientes dos relatórios de cruzeiro:

- (i) Designação do cruzeiro (ID) e investigador(es) principal(is).
- (ii) Se não listado no relatório de cruzeiro em outro lugar, informações da estação CTD, incluindo posição da estação, hora, profundidades de amostragem, número de garrafas, etc. (iii) Nomes e afiliações dos analistas. (iv) Número de amostras analisadas, lotes de padrões usados, trocas de tubo e coluna da bomba.
- (v) Equipamento, metodologia e reagentes utilizados.
- (vi) Amostragem e quaisquer procedimentos de armazenamento. (vii) Informações, métodos e valores padrão de calibração. (viii) Procedimentos de coleta e processamento de dados. (ix) Detalhes de quaisquer problemas e soluções que ocorreram.
- (x) QC/QA:
 - exatidão declarada e precisão analítica; • limites de detecção;
 - valores de amostras de verificação e/ou padrões de rastreamento; • valores medidos dos materiais de referência (incluindo qual lote foi usado e valores atribuídos ou certificados);
 - se e como as normalizações foram feitas nos dados, com base nas amostras internas de verificação/rastreamento ou no CRM.
- (xi) Referências Científicas.

Arquivos de Dados da

Garrafa Os dados das análises de nutrientes devem ser mesclados em arquivos com valores de viagem da garrafa CTD, incluindo profundidade e número da garrafa CTD, dados do sensor CTD e outros parâmetros químicos que são medidos durante a expedição de cruzeiro/pesquisa. Cada parâmetro deve incluir um campo para sinalizadores de controle de qualidade associados.

Os nutrientes serão medidos e os resultados iniciais relatados do AA serão em $\mu\text{mol/L}$, por isso é imperativo também medir e registrar a temperatura analítica do laboratório para que possa ser usada junto com a salinidade para cálculo e relatório final dos resultados em $\mu\text{mol/kg}$.

A conversão de volumes (litros) para unidades de massa (kg) deve ser calculada com base na densidade da água do mar e na equação de estado (Millero et al., 1980). A equação de estado foi atualizada em Roquet et al. (2015). Qualquer uma dessas duas equações pode ser usada, mas qual foi implementada deve ser claramente declarada e referenciada nos metadados.

Se materiais de referência foram analisados, o fabricante, o número do lote e os valores fornecidos devem ser incluídos no arquivo do frasco.

CONCLUSÃO

Dados de nutrientes de alta qualidade podem ser obtidos seguindo os procedimentos descritos neste manual. Se a atenção aos detalhes de

configuração do instrumento autoanalisador de nutrientes para o QC final dos dados, é possível obter os dados de macronutrientes inorgânicos de alta qualidade (exatos e precisos) que são exigidos por programas internacionais de escala global, incluindo GO-SHIP e GEOTRACES, bem como programas que estudam áreas e processos específicos nos oceanos do mundo, como estações e transectos de séries temporais oceânicas.

DECLARAÇÃO DE DISPONIBILIDADE DE DADOS

Os dados brutos que sustentam as conclusões deste artigo serão disponibilizados pelos autores, sem reservas indevidas, a qualquer pesquisador qualificado.

CONTRIBUIÇÕES DO AUTOR

SB, EMSW, MA, KB, CM e TT coordenaram e realizaram a revisão final e conclusão do manuscrito em um workshop realizado na SCRIPPS Institution em 2019. SB, EMSW, MA, KB, CM e TT eram todos membros do International SCOR Working Group #147 do qual este manual é um dos resultados finais. Todos os autores contribuíram para a redação do manuscrito inicial e forneceram revisões e contribuições para as versões revisadas.

FINANCIAMENTO

O trabalho do WG #147 apresentado neste artigo resulta, em parte, de financiamento fornecido por comitês nacionais do Comitê Científico de Pesquisa Oceânica (SCOR) e de uma bolsa para SCOR da US National Science Foundation (OCE-1840868), mais apoio da US National Science Foundation (Grant OCE 1546580). Este manual foi endossado pelo Painel de Especialistas em Biogeoquímica do IOCCP/GOOS como uma prática recomendada para conduzir todos os aspectos da análise de nutrientes especificamente para análise de fluxo contínuo usando um analisador automático de fluxo segmentado.

AGRADECIMENTOS

Este Manual de Nutrientes foi escrito e revisado por membros do GT #147: Rumo à comparabilidade dos dados globais de nutrientes oceânicos (COMPONUT) do Comitê Científico de Pesquisa Oceânica (SCOR).

Agradecemos as contribuições feitas por outros membros do WG #147: Andrew Dickson, Bernadette Sloyan, Karin Bjorkman, Anne Daniel, Hema Naik e Raymond Roman.

Para tornar este novo Manual o mais globalmente inclusivo possível, houve uma fase de 4 meses de disponibilidade pública para comentários até a primavera de 2019, onde o rascunho do manuscrito estava disponível para download nos sites do IOCCP e GO-SHIP, e também no Ocean Site de Melhores Práticas (OBP). Agradecemos a todos os colegas que revisaram o manuscrito e forneceram comentários úteis e sugestões para melhorias na versão final.

REFERÊNCIAS

- Aminot, A., e Kirkwood, DS (1995). Relatório sobre os resultados do quinto estudo intercomparativo do CIEM para nutrientes na água do mar. Cooperativa ICES. Res. Rep. 213:79.
- Aminot, A. e Kerouel, R. (1995). Material de referência para nutrientes em água do mar: estabilidade de nitrato, nitrito, amônio e fosfato em amostras autoclavadas. *Mar. Chem.* 49, 221–232. doi: 10.1016/0304-4203(95)00004-b
- Aminot, A., Kerouel, R. e Coverly, S. (2009). "Nutrientes na água do mar usando análise de fluxo segmentada", em *Orientações Práticas para a Análise da Água do Mar*, ed. W. Oliver (Flórida: CRC Press), 143–178.
- Aoyama, M. (2006). 2003. Exercício de intercomparação para material de referência para nutrientes em água do mar em uma matriz de água do mar. *Tecnologia Rep. Meteorol. Res. Inst.* 50:91.
- Aoyama, M. (2010). 2008 Estudo Comparativo Interlaboratorial de um Material de Referência para Nutrientes em Água do Mar. *Tecnologia Rep. Meteorol. Res. Inst.* 60:134.
- Aoyama, M., Abad, M., Anstey, C., Ashraf, MP, Bakir, A., Becker, S., et al. (2016). IOCCP-JAMSTEC 2015 Exercício de calibração interlaboratorial de um material de referência certificado para nutrientes em água do mar. Yokosuka: Agência Japonesa para Ciência e Tecnologia Marinho-Terra.
- Aoyama, M., Bakker, K., van Ooijen, J., Ossebaer, S., and Woodward, EMS (2015). Relatório de um Workshop Internacional de Nutrientes com foco na Análise de Fosfato. Japão: Desastre nuclear de Fukushima Daiichi.
- Aoyama, M., Barwell-Clarke, J., Becker, S., Blum, M., Braga, ES, Coverly, SC, et al. (2008). 2006 Exercício de intercomparação para material de referência para nutrientes em água do mar em uma matriz de água do mar. *Tecnologia Rep. Meteorol. Res. Inst.* 58:104.
- Aoyama, M., Becker, S., Minhan, D., Hideshi, D., Louis, IG, Kasai, H., et al. (2007). Comparabilidade recente de dados oceanográficos de nutrientes: Resultados de um exercício de intercomparação de 2003 usando materiais de referência. *Analy. ciência* 23, 1151–1154. doi: 10.2116/analsci.23.1151
- Armstrong, FAJ, Stearns, CA e Strickland, JDH (1967). A medição da ressurgência e processos biológicos subsequentes por meio do Technicon Autoanalyzer e equipamentos associados. *Res. do Mar Profundo.* 14, 381–389. doi: 10.1016/0011-7471(67)90082-4 Becker, S., Michio Aoyama, E., Malcolm, S., Woodward, Karel
- Bakker, Stephen Coverly, et al. (2019). Manual de nutrientes de hidrografia de repetição GO-SHIP: a determinação precisa e precisa de nutrientes inorgânicos dissolvidos na água do mar, usando métodos de análise de fluxo contínuo, no Manual de hidrografia de repetição de GO-SHIP: uma coleção de relatórios e diretrizes de especialistas, disponível online em: <https://www.oceanbestpractices.net/handle/11329/1023> (acessado em 5 de dezembro de 2019).
- Bernhardt, H., e Wilhelms, A. (1967). A determinação contínua de ferro de baixo nível, fosfato solúvel e fosfato total com o AutoAnalyzer. *Tecnologia Simp.* 1, 385–389.
- Burton, JD, Leatherland, TM e Liss, PS (1970). A reatividade do silício dissolvido em algumas águas naturais. *Limnol. Oceanogr.* 15, 472–476.
- Daniel, A., Kerouel, R., e Aminot, A. (2012). Pasteurização: Um método confiável para preservação de nutrientes em amostras de água do mar para aplicações interlaboratoriais e de campo. *Mar. Chem.* 128–129, 57–63. doi: 10.1016/j.marchem.2011.10.002 Dickson, AG, Sabine, CL e Christian, JR (eds) (2007). Guia de boas práticas para medições de CO₂ oceânico. *Espec. PICES.* Publ. 3:191.
- Dore, JE, Houlihan, T., Hebel, DV, Tien, G., Tupas, L., and Karl, DM (1996). Congelamento como método de preservação de amostras para análise de nutrientes inorgânicos dissolvidos na água do mar. *Mar. Chem.* 53, 173–185. doi: 10.1016/0304-4203(96)00004-7
- Grasshoff, K., Kremling, K., e Ehrhardt, M. (eds) (1983). Determinação de nutrientes. Em *Métodos de análise da água do mar*, Alemanha: Wiley-VCH.
- Holmes, RM, Aminot, A., Kerouel, R., Hooker, BA e Peterson, BJ (1999). Um método simples e preciso para medir a amônia em ecossistemas marinhos e de água doce. *Pode. J. Fisher. Aqua. ciência* 56, 1801–1808. doi: 10.1139/f99-128 Hoppema, M., Bakker, K., v. Heuven, SMAC, v. Ooijen, JC, and de Baar, H. (2015). Distribuições, tendências e variabilidade interanual de nutrientes ao longo de uma seção repetida através do Mar de Weddell (1996–2011). *Mar. Chem.* 177, 545–553. doi: 10.1016/j.marchem.2015.08.007 Hydes, DJ, Aoyama, M., Aminot, A., Bakker, K., Becker, S., Coverly, S., et al. (2010). Determinação de nutrientes dissolvidos (N, P, Si) na água do mar com alta precisão e intercomparabilidade usando analisadores de fluxo contínuo segmentados por gás. GO-SHIP Repeat Hydrography Manual: Uma coleção de relatórios e diretrizes de especialistas. Relatório nº 14 do IOCCP, série de publicações do ICPO nº 134, versão 1. Conselho Internacional para a Exploração do Mar [ICES] (1967). Relatório sobre a análise de fosfato nos ensaios de intercalibração de métodos químicos do ICES realizados em Copenhague, 1966. ICES CM 1967/C: 20. Dinamarca: ICES. Conselho Internacional para a Exploração do Mar [ICES] (1977). O Exercício Internacional de Intercalibração para Métodos de Nutrientes. ICES Cooperative Research Report No. 67, 44 pp. Denmark: ICES. Jones, R. (1991). Um método de fluorescência aprimorado para a determinação de concentrações nanomolares de amônio em águas naturais. *Limnol. Oceanogr.* 36, 814-819. doi: 10.4319/lo.1991.36.4.0814 Kerouel, R. e Aminot, A. (1997). Determinação fluorométrica de amônia em águas marinhas e estuárias por análise direta de fluxo segmentado. *Mar. Chem.* 57, 265-275. doi: 10.1016/s0304-4203(97)00040-6 Key, RM, Kozyr, A., Sabine, CL, Lee, K., Wanninkhof, R., Bullister, JL, et al. (2004). Uma climatologia global de carbono oceânico: Resultados do Projeto Global de Análise de Dados (GLODAP). *Glob. Biogeochem. Ciclo* 18:GB4031. Key, RM, Tanhua, T., Olsen, A., Hoppema, M., Jutterström, S., Schirnack, C., et al. (2010). O projeto de síntese de dados CARINA: introdução e visão geral. *Terra Sys. ciência Dados* 2, 105–121. doi: 10.5194/essd-2-105-2010 Kirkwood, DS, Aminot, A. e Perttill, M. (1991). Relatório sobre os resultados do quarto Exercício de Intercalibração ICES para Nutrientes em Água do Mar. Cooperativa ICES. Res. Rep. 174:83. Lauvset, SK e Tanhua, T. (2015). Uma caixa de ferramentas para controle secundário de qualidade em química oceânica e dados hidrográficos. *Limnol. Oceanogr. Métodos* 13, 601–608. doi: 10.1002/lom3.10050 MacDonald, RW e McLaughlin, FA (1982). O efeito do armazenamento por congelamento em fosfato inorgânico dissolvido, nitrato e silicato reativo para amostras de águas costeiras e estuárias. *Água Res.* 1, 95-104. doi: 10.1016/0043-1354(82) 90058-6 MacDonald, RW, McLaughlin, FA e Wong, CS (1986). Armazenamento de amostras de silicato reativo por congelamento. *Limnol. Oceanogr.* 31, 1139–1142. doi: 10.4319/lo. 1986.31.5.1139 Millero, FJ, Chen, C.-T., Bradshaw, A. e Schleicher, K. (1980). Uma nova equação de estado de alta pressão para a água do mar. *Res. do Mar Profundo. Parte A* 27, 255–264. Moore, CM (2016). Diagnosticando a deficiência de nutrientes oceânicos. *Philos. Trans. Uma matemática. Física Eng. ciência* 374:20150290. doi: 10.1098/rsta.2015.0290 Murphy, J. e Riley, JP (1962). Um Método de Solução Única Modificado para a Determinação de Fosfato em Águas Naturais. *Analy. Chim. Acta* 27, 31–36. doi: 10.1016/s0003-2670(00)88444-5 Olsen, A., Key, RM, van Heuven, S., Lauvset, SK, Velo, A., Lin, X., et al. (2016). Um produto de dados internamente consistente para o oceano mundial: o Global Ocean Data Analysis Project, versão 2 (GLODAPv2). *Terra Sist. ciência Discussão de Dados.* 8, 1–78. doi: 10.1007/1-4020-4028-8_1 Olsen, A., Lange, N., Key, RM, Tanhua, T., Álvarez, M., Becker, S., et al. (2019). GLODAPv2.2019 – uma atualização do GLODAPv2. *Terra Sist. ciência Dados* 11, 1437–1461. Osborne, J., Swift, J. e Osborne, M. (2020). Java OceanAtlas 5.5 [Software de computador]. Disponível online em: <https://joa.ucsd.edu> (acessado em junho de 2020). Roquet, F., Madec, G., McDougall, TJ e Barker, PM (2015). Expressões polinomiais precisas para a densidade e volume específico da água do mar usando o padrão TEOS-10. *Modelo Oceano.* 90, 29–43. doi: 10.1016/j.ocemod.2015. 04.002 Sakamoto, CM, Friederich, GE e Codispoti, LA (1990). Procedimentos MBARI para análises automatizadas de nutrientes usando um analisador de fluxo rápido Alpkem Series 300 modificado. *Monter. Baía Aqua. Res. Inst. Tecnologia Rep.* 9:84. Strickland, JDH e Parsons, TR (1972). Um manual prático de análise da água do mar (2ª edição). J. Peixe. Res. Bd. Pode. 167:311. Schlitzer, Reiner (2020). Exibição de dados do oceano. Disponível online em: odv.awi.de. Sloyan, BM, Wanninkhof, R., Kramp, M., Johnson, GC, Talley, LD, Tanhua, T., et al. (2019). O programa global de investigações hidrográficas baseadas em navios oceânicos (GO-SHIP): uma plataforma para ciência oceânica multidisciplinar integrada. *Fronte. Mar. Sci.* 6:445. doi: 10.3389/fmars.2019.00445 Suzuki, T., Ishii, M., Aoyama, A., Christian, JR, Enyo, K., Kawano, T., et al. (2013). Projeto de Síntese de Dados PACIFICA, ORNL/CDIAC-159, NDP-092, Centro de Análise de Informações de Dióxido de Carbono, Oak Ridge: Oak Ridge National Laboratory.

- Swift, JH (2010). Dados de amostra de água de qualidade de referência: notas sobre aquisição, manutenção de registros e avaliação. GO-SHIP Repeat Hydrography Manual: Uma coleção de relatórios e diretrizes de especialistas. Relatório nº 14 do IOCCP, série de publicações do ICPO nº 134, versão 1.
- Talley, LD, Feely, RA, Sloyan, BM, Wanninkhof, R., Baringer, MO, Bullister, JL, et al. (2016). Mudanças no calor do oceano, conteúdo de carbono e ventilação: uma revisão da primeira década da hidrografia de repetição global GO-SHIP. *Annu. Rev. Mar. Sci.* 8, 185–215. doi: 10.1146/annurev-marine-052915-100829
- Tanhua, T., van Heuven, S., Key, RM, Velo, A., Olsen, A. e Schirnick, C. (2010). Procedimentos e métodos de controle de qualidade do banco de dados CARINA. *Terra Syst. ciência Dados* 2, 35–49. doi: 10.5194/essd-2-35-2010
- Topping, G. (1997). QUASIMEME: medições de qualidade para monitoramento marinho. Revisão do projeto da UE 1993-1996. *Mar. Poluição. Touro.* 35, 1–201.
- Organização das Nações Unidas para a Educação, a Ciência e a Cultura UNESCO (1965). "Relatório sobre as medições de intercalibração," UNESCO Technical Papers in Marine Science, (Paris: UNESCO).
- Organização das Nações Unidas para a Educação, a Ciência e a Cultura UNESCO (1967). "Relatório sobre medições de intercalibração," UNESCO Technical Papers in Marine Science, (Paris: UNESCO).
- Zhang, JZ, Fischer, CJ e Ortner, PB (1999). Otimização do desempenho e minimização da interferência do silicato na análise de fosfato de fluxo contínuo. *Talanta* 49, 293–304. doi: 10.1016/S0039-9140(98)00377-4 Zhang, JZ e Ortner, PB (1998). Efeito das condições de descongelamento na recuperação de ácido silícico reativo de amostras de água natural congelada. *Água Res.* 32, 2553–2555. doi: 10.1016/s0043-1354(98)00005-0

Conflito de Interesses: SC era funcionário da empresa BLTEC Korea Limited.

Os demais autores declaram que a pesquisa foi realizada na ausência de quaisquer relações comerciais ou financeiras que possam ser interpretadas como um potencial conflito de interesses.

Copyright © 2020 Becker, Aoyama, Woodward, Bakker, Coverly, Mahaffey e Tanhua. Este é um artigo de acesso aberto distribuído sob os termos da Creative Commons Attribution License (CC BY). O uso, distribuição ou reprodução em outros fóruns é permitido, desde que o(s) autor(es) original(is) e o(s) detentor(es) dos direitos autorais sejam creditados e que a publicação original nesta revista seja citada, de acordo com a prática acadêmica aceita. Nenhum uso, distribuição ou reprodução é permitido que não esteja de acordo com estes termos.