

# EXPEDICIÓN DE CIRCUNNAVEGACIÓN MALASPINA 2010

CAMBIO GLOBAL Y EXPLORACIÓN  
DE LA BIODIVERSIDAD DEL OCÉANO

*Libro blanco de métodos y técnicas  
de trabajo oceanográfico*



ENRIQUE MORENO-OSTOS (ed.)

**CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS**



# EXPEDICIÓN DE CIRCUNNAVEGACIÓN MALASPINA 2010: CAMBIO GLOBAL Y EXPLORACIÓN DE LA BIODIVERSIDAD DEL OCÉANO

LIBRO BLANCO DE MÉTODOS Y TÉCNICAS  
DE TRABAJO OCEANOGRÁFICO







EQUIPO DE TRABAJO

Carlos M. Duarte – Pedro Joaquín Vélez – Eugenio Fraile  
Marta Álvarez – Jordi Dachs – Nuria Navarro – José María Blanco  
Jesús María Arrieta – Josep M. Gasol – Juan Ignacio González Gordillo

# EXPEDICIÓN DE CIRCUNNAVEGACIÓN MALASPINA 2010: CAMBIO GLOBAL Y EXPLORACIÓN DE LA BIODIVERSIDAD DEL OCÉANO

## LIBRO BLANCO DE MÉTODOS Y TÉCNICAS DE TRABAJO OCEANOGRÁFICO

EDITOR

ENRIQUE MORENO-OSTOS



Fundación **BBVA**



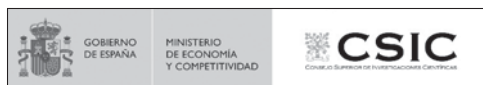
CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS  
MADRID, 2012

Reservados todos los derechos por la legislación en materia de Propiedad Intelectual. Ni la totalidad ni parte de este libro, incluido el diseño de la cubierta, puede reproducirse, almacenarse o transmitirse en manera alguna por medio ya sea electrónico, químico, óptico, informático, de grabación o de fotocopia, sin permiso previo por escrito de la editorial.

Las noticias, los asertos y las opiniones contenidos en esta obra son la exclusiva responsabilidad del autor o autores. La editorial, por su parte, solo se hace responsable del interés científico de sus publicaciones.

Esta publicación es una contribución al proyecto «Expedición de Circunnavegación Malaspina 2010: cambio global y exploración del océano global», financiado por el programa CONSOLIDER-INGENIO 2010 del Ministerio de Economía y Competitividad (ref. CSD2008-00077).

*Catálogo general de publicaciones oficiales:*  
<http://publicacionesoficiales.boe.es/>



Fundación **BBVA**



© CSIC  
© Enrique Moreno-Ostos (ed.)  
© Fotografía de cubierta: Josep M. Gasol

ISBN: 978-84-00-09419-5  
e-ISBN: 978-84-00-09433-1  
NIPO: 472-11-214-6  
e-NIPO: 472-11-215-1  
Depósito Legal: M. 14.949-2012

Maquetación, impresión y encuadernación:  
Gráficas/85, S.A.  
Impreso en España. *Printed in Spain*

En esta edición se ha utilizado papel ecológico sometido a un proceso de blanqueado TCF, cuya fibra procede de bosques gestionados de forma sostenible.

## Índice

<b>PRÓLOGO</b> .....	13
<b>1. OCEANOGRAFÍA FÍSICA</b> .....	17
– Medidas de conductividad, temperatura y presión .....	19
– Adquisición y control de datos LADCP .....	37
– Análisis de muestras de salinidad. Salinómetro de laboratorio Autosal 8400B .....	67
<b>2. BIOGEOQUÍMICA DEL OCÉANO: CARBONO, NUTRIENTES Y GASES TRAZA</b> .....	77
– Muestreo y análisis de oxígeno disuelto (O <sub>2</sub> ) en agua de mar .....	79
– Determinación espectrofotométrica del pH mediante el uso de púrpura de m-cresol .....	87
– Determinación de la alcalinidad mediante valoración rápida a doble punto final .....	93
– Muestreo de nutrientes inorgánicos disueltos (DIN), nitrógeno (TN) y fósforo (TP) totales .....	103
– Muestreo y análisis de nutrientes inorgánicos disueltos en agua de mar .....	107
– Análisis de amonio en aguas marinas y aguas dulces por fluorimetría .....	123
– Filtración en rampa con presión positiva para el análisis del carbono, nitrógeno, fósforo particulado (C/N y P) y de los isótopos estables de carbono ( <sup>13</sup> C/ <sup>12</sup> C) y nitrógeno ( <sup>15</sup> N/ <sup>14</sup> N) del material en suspensión .....	133

– Determinación de carbono y nitrógeno orgánico particulados mediante analizador elemental . . . . .	139
– Determinación de nitrógeno total (TN) por el método de la oxidación con persulfato en medio alcalino . . . . .	143
– Análisis manual de la concentración de fósforo reactivo soluble (SRP) por el método espectrofotométrico de la formación del complejo azul de fosfomolibdato . . . . .	149
– Determinación de fósforo total (TP) y particulado ( $P_{part}$ ) por el método de la oxidación con persulfato en medio ácido . . . . .	157
– Muestreo de carbono orgánico total (TOC) y nitrógeno total (TN) . . . . .	163
– Muestreo de carbono y nitrógeno orgánico volátil . . . . .	167
– Recogida de muestras de materia orgánica particulada (POM) y disuelta ultrafiltrada (UDOM) en el océano profundo . . . . .	177
– Recogida y análisis a bordo de muestras de materia orgánica disuelta cromófora: absorbancia (aDOM) y fluorescencia (FDOM) . . . . .	191
– Determinación del consumo de $^{15}NO_3^-$ , $^{15}NH_4^+$ , $^{15}N$ -urea y fijación de $^{15}N_2$ . . . . .	211
– Determinación manual de urea en agua de mar . . . . .	225
– Muestreo de metales y vitaminas disueltas . . . . .	233
– Muestreo de agua de mar para el análisis de dimetilsulfuro (DMS) y dimetilsulfoniopropionato (DMSP) por cromatografía de gases (GC) . . . . .	239
– Análisis de DMS con cromatografía de gases (GC) acoplada a un detector fotométrico de llama (FPD) selectivo para azufre . . . . .	243
– Sistema para el análisis en continuo de la razón $^{13}C/^{12}C$ y concentraciones del $CO_2$ atmosférico y del DIC marino . . . . .	253
– Extracción de gases disueltos y su almacenamiento para análisis isotópico . . . . .	265
– Composición isotópica del vapor atmosférico . . . . .	275
– Medidas de tasas de disipación de energía cinética turbulenta . . . . .	287
<b>3. CONTAMINANTES Y DEPOSICIÓN ATMOSFÉRICA . . . . .</b>	<b>313</b>
– Muestreo de partículas marinas superficiales (5 m) para posterior análisis de compuestos orgánicos . . . . .	315
– Muestreo de compuestos orgánicos en la fase disuelta y en partículas marinas superficiales (5 m) . . . . .	319
– Muestreo de compuestos orgánicos en el agua de lluvia (deposición húmeda) . . . . .	323

– Muestreo de compuestos orgánicos en la atmósfera y estudio de su difusividad en agua marina (deposición seca).	327
– Muestreo de compuestos orgánicos fluorados en la fase disuelta y en partículas marinas superficiales (3 m y máximo profundo de clorofila) . . . . .	331
– Muestreo de aerosoles . . . . .	337
– Muestreo de aerosoles PM 2.5 . . . . .	341
– Muestreo de aerosoles (TSP) y compuestos semi-volátiles en la fase gas . . . . .	345
– Toma de muestras de bioaerosoles . . . . .	351
– Muestreo de compuestos orgánicos en el fitoplancton/zooplancton de la zona fótica de la columna de agua (hasta el DCM) . . . . .	359
– Muestreo de fitoplancton en la zona fótica (3 m, DCM y DCM + 40) para el estudio de la expresión génica influenciada por contaminantes orgánicos persistentes . . . . .	363
– Muestreo de plancton en la vertical de la zona fótica (hasta DCM + 20) para el estudio de la expresión génica influenciada por contaminantes orgánicos persistentes . . . . .	367
<b>4. ÓPTICA, FITOPLANCTON Y METABOLISMO DEL OCÉANO . . . . .</b>	<b>371</b>
– Espectros de absorción de la luz por el material disuelto . . . . .	373
– Determinación de los espectros de absorción de la luz por las partículas . . . . .	377
– Determinación de la abundancia de nano y picofitoplancton mediante citometría de flujo . . . . .	381
– Toma de muestras de fitoplancton mayor de 20 µm para análisis de imagen . . . . .	387
– Cuantificación de la abundancia de células vivas y muertas de las comunidades de picoplancton . . . . .	391
– Determinación fluorimétrica de la concentración de clorofila <i>a</i> . . . . .	399
– Análisis de pigmentos fotosintéticos del fitoplancton mediante HPLC . . . . .	407
– Muestreo de cocolitóforos . . . . .	415
– Muestreo de fitoplancton por medio de redes . . . . .	419
– Muestreo de fitoplancton desde las botellas Niskin . . . . .	423
– Cuantificación del metabolismo de la comunidad pelágica mediante el método Winkler . . . . .	425
– Cuantificación de la producción primaria bruta mediante <sup>18</sup> O (GPP- <sup>18</sup> O) . . . . .	431
– Determinación de la producción primaria fraccionada por tamaños . . . . .	437

– Determinación de la producción fotosintética de carbono orgánico disuelto . . . . .	443
– Determinación de la producción primaria en presencia de radiación ultravioleta solar (UVR) . . . . .	447
– Determinación de la tasa de calcificación (PICp) . . . . .	451
– Tasas de lisis celular del fitoplancton . . . . .	455
– Estimación de la tasa bruta de crecimiento del pico-fitoplancton mediante análisis del índice mitótico . . . . .	461
– Toxicidad de contaminantes orgánicos para las poblaciones de fitoplancton oceánico . . . . .	467
– Tasas de predación y crecimiento del fitoplancton mediante técnicas de dilución . . . . .	473
 5. BIODIVERSIDAD MICROBIANA Y FUNCIÓN ECOLÓGICA . . .	479
– Muestreo para recuentos de microorganismos por epifluorescencia . . . . .	481
– Determinación de la abundancia y la actividad individual de bacterias y arqueas mediante citometría de flujo . . . .	487
– Muestreo para recuentos de flagelados heterotróficos por citometría de flujo . . . . .	497
– Determinación de abundancia de virus por citometría de flujo . . . . .	503
– Determinación de la abundancia y contenido de pigmento de las bacterias fototróficas aeróbicas anoxigénicas . . . .	511
– Medida de Partículas Exopoliméricas Transparentes (TEP) en agua marina . . . . .	515
– Concentración de biomasa de picoeucariotas, bacterias y virus marinos para la extracción de ácidos nucleicos . . . .	521
– Incorporación de bromodeoxiuridina en ADN microbiano para la detección de filotipos activos . . . . .	533
– Muestreo para el estudio de la diversidad del plancton microbiano a partir de sondas específicas . . . . .	539
– Obtención de muestras para la determinación de la composición de la comunidad vírica . . . . .	543
– Determinación de la diversidad funcional del bacterioplancton marino . . . . .	553
– Determinación de la actividad bacteriana mediante la incorporación de leucina radiactiva . . . . .	557
– Medida de la respiración mediante cambios <i>in vitro</i> de la concentración de O <sub>2</sub> . . . . .	565
– Estudio de la cuantificación de CID por el plancton procariota mesopelágico ( $\geq 200$ m) . . . . .	575
– Actividad enzimática de los procariotas planctónicos . . . .	579

– Estudio de la actividad del plancton procariota profundo ( $\geq 100$ m) . . . . .	567
– Determinación de la depredación bacteriana debida a protistas, mediante la desaparición en el tiempo de trazadores (bacterias marcadas con un compuesto fluorescente, FLB: <i>fluorescent labeled bacteria</i> ) . . . . .	591
– Determinación de la producción de virus como consecuencia de la lisis bacteriana . . . . .	599
<b>6. DISTRIBUCIÓN Y FUNCIÓN DEL ZOOPLANCTON EN EL OCÉANO . . . . .</b>	<b>603</b>
– Muestreo de microzooplancton profundo ( $> 2000$ m) . . . . .	605
– Muestreo de microplancton superficial . . . . .	613
– Procesado de muestras de plancton para el análisis de isótopos estables . . . . .	617
– Procesado de muestras de zooplancton gelatinoso para taxonomía, <i>barcoding</i> y análisis del contenido en carbono. . . . .	623
– Procesado de muestras de zooplancton para análisis de actividad enzimática . . . . .	647
– Muestreo de zooplancton neustónico . . . . .	651
– Descripción de procedimientos para trabajos de acústica con sonda EK60 . . . . .	657
– Muestreo de fitoplancton para extracción de PUA (aldehídos volátiles poliinsaturados) . . . . .	673
– Procesado de muestras de zooplancton para el análisis fisiológico y bioquímico de la respiración y excreción de amonio . . . . .	677





## Prólogo

Nuestro conocimiento sobre el océano se deriva de un mosaico de medidas tomadas por la flota oceanográfica internacional que se van recopilando para conformar un atlas de las propiedades del océano. Los patrones de variación que resultan de este ejercicio de síntesis están afectados por el grado en el cual las medidas tomadas por distintos investigadores son comparables, lo que añade un factor de variación que puede distorsionar notablemente la imagen resultante. Conscientes de ello, algunas comunidades dentro de las ciencias marinas han hecho esfuerzos por estandarizar sus métodos y protocolos, de forma que las distorsiones debidas a las asociadas al operario sean lo más pequeñas posibles o, cuando menos, de una magnitud conocida. Estas comunidades incluyen de forma destacada a los oceanógrafos físicos, que abordaron este problema de estandarización de métodos y protocolos de medidas durante el programa WOCE (World Ocean Circulation Experiment), que tuvo lugar entre 1988 y 1998. Los oceanógrafos químicos también han hecho intentos de estandarizar procedimientos pero ya limitados a propiedades individuales, como la medida de nutrientes inorgánicos disueltos, la medida de carbono orgánico disuelto, y la de alcalinidad y pH en el océano, pero sin lograr la universalidad en su aplicación que logró el programa WOCE en cuanto a las propiedades físicas. El programa JGOFS (Joint Global Ocean Flux Study, [www1.whoi.edu/](http://www1.whoi.edu/)) desarrollado en los años 1980 y 1990 también intentó estandarizar algunas medidas de propiedades y procesos biológicos, como la concentración de clorofila *a* o la producción primaria, aunque de nuevo con poco éxito en el desarrollo de estándares absolutos. La diferencia en el grado de éxito de estas comunidades en poder formular estándares surge del hecho de que

las medidas de propiedades físicas estaban ya claramente consolidadas, en cuanto a las propiedades a medir y en cierto modo los métodos de medida, en los años 1960, mientras que muchas propiedades biológicas y biogeoquímicas que ahora entendemos como claves para comprender el funcionamiento del océano global han sido introducidas recientemente.

El equipo de investigación de la Expedición Malaspina 2010 se dio de bruces precisamente con este problema, pues los casi 30 equipos de investigación participantes tienen tradiciones y culturas diferentes y, por tanto, tenían distintos protocolos para abordar los mismos problemas, reflejando quizás el grado de dispersión en cuanto a protocolos analíticos existente en la comunidad oceanográfica global. El proyecto persigue desarrollar una línea de base coherente que permita evaluar el impacto del cambio global sobre el océano, incluyendo entre las propiedades evaluadas algunas, como los flujos de contaminantes orgánicos persistentes, composición genómica de las comunidades microbianas del océano profundo y las transportadas por la atmósfera, que nunca antes habían sido evaluadas a esta escala global.

Además, con una duración de siete meses y con dos buques trabajando en paralelo durante tres de estos era imposible que fuese el mismo analista quien midiese las propiedades de interés durante toda la expedición. Era pues fundamental asegurar por un lado que los protocolos adoptados eran los mejores y más robustos posibles y por otro lado asegurar que las variaciones en las medidas en distintas regiones del océano se debían a que las propiedades de interés realmente variaban y no a que el analista a cargo era una persona distinta.

La herramienta clave para asegurar estas dos cuestiones capitales fue el *Libro blanco* de procedimientos de la Expedición Malaspina 2010, un libro que ha visto varias fases de borrador y dos revisiones sustanciales antes de haberse consolidado como el referente para reproducir todas las medidas llevadas a cabo durante la Expedición Malaspina 2010. El *Libro blanco* es, pues, un manual actualizado e interdisciplinar de protocolos en oceanografía, el primero y único que existe con un carácter plenamente interdisciplinar. Más aún, este manual ofrece protocolos que han sido ya sometidos a prueba en una expedición de circunnavegación y que son por tanto aplicables a todos los océanos y bajo todas las condiciones de trabajo imaginables. De ahí pues la decisión de publicarlo, con el sello del CSIC, para que otros investigadores puedan también tener acceso a estos protocolos.

La lengua vehicular en ciencia es la inglesa, sin embargo el *Libro blanco* está escrito en español. Esta también fue una decisión deliberada y madurada por el equipo de la Expedición Malaspina 2010, pues pensamos que este esfuerzo intelectual no tenía por qué seguir necesariamente el paso de publicación en lengua inglesa que sufren la mayor parte de nuestras publicaciones, sino que existe una comunidad oceanográfica en países de habla hispana suficientemente amplia como para que este libro encon-

trase suficientes lectores. Más aún, siendo una comunidad oceanográfica emergente pensamos también que este *Libro blanco* sería de mayor utilidad a la comunidad oceanográfica hispana que no a la comunidad global, muchos de los cuales tienen ya tradiciones establecidas que posiblemente cueste desplazar hacia los protocolos que hemos adoptado en la Expedición Malaspina.

El paso del *Libro blanco* como documento de referencia y trabajo interno a obra editada y publicada ha requerido de un esfuerzo adicional del editor de la obra, Enrique Moreno-Ostos, y de sus muchos autores, ya que esta última edición se ha hecho una vez concluida la Expedición Malaspina y se ha realizado por tanto con generosidad y vocación de servicio y no por necesidad. Así pues deseo agradecer a todos los autores, y especialmente a Enrique Moreno-Ostos, el trabajo realizado para publicar esta obra, y a Miguel Ángel Puig-Samper, director de Publicaciones del CSIC, por su apoyo para que esté disponible para toda la comunidad oceanográfica que realiza su trabajo usando el español como lengua vehicular.

En Perth, Australia, a 5 de noviembre de 2011

Carlos M. Duarte Quesada

*Coordinador Expedición Malaspina 2010*



# 1

## OCEANOGRAFÍA FÍSICA

---



## Medidas de conductividad, temperatura y presión

Benítez Barrios, V. M.; Nuez de la Fuente, M.; Vélez Belchí, P.;  
López Laatzen, F.; Fraile Nuez, E.

*C.O. Canarias, Instituto Español de Oceanografía*

### Finalidad. Campo de aplicación

Protocolo de adquisición y procesado de datos del CTD 911*plus* (por sus siglas en inglés, Conductivity-Temperature-Depth) para la obtención de perfiles oceánicos de alta resolución de temperatura y conductividad.

### Conceptos generales

Los océanos constituyen uno de los principales componentes del sistema climático. Su alta capacidad calorífica y de circulación le confieren la habilidad de almacenar y distribuir calor, agua dulce y gases disueltos que ha intercambiado con la atmósfera. Es por esta razón que los océanos se consideran la “memoria” de la atmósfera y uno de los principales reguladores del clima. Este hecho es evidente a partir de estudios recientes cuyas conclusiones mantienen que la temperatura global del océano se ha incrementado en la capa de 0 a 700 metros desde 1961 y que las zonas subtropicales, al contrario que las zonas subpolares, están sufriendo un aumento de la salinidad. Como consecuencia, la detección de variaciones en variables oceánicas clave como la temperatura o la salinidad es indispensable para la determinación y predicción del cambio climático.

### Equipamiento necesario

El sistema de medida está constituido por un carrusel (SBE 32), una unidad submarina (SBE 9*plus*) y una unidad de cubierta (SBE 11*plus*) (Figura 1).

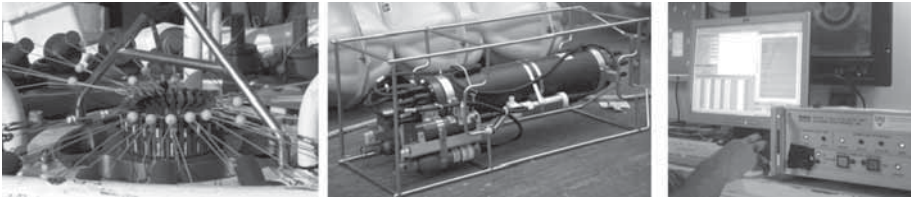


Figura 1. Carrusel, unidad submarina con sensores redundantes de temperatura y conductividad y unidad de cubierta.

El carrusel es una estructura metálica de soporte con forma cilíndrica que alberga un disparador automático capaz de activar el cierre de las botellas Niskin instaladas. Los extremos de cada una de las botellas permanecen conectadas entre sí por una cuerda de neopreno que atraviesa la botella, y estos a su vez se conectan con un cabo de nailon al gatillo del disparador manteniéndolos abiertos. Cuando el disparador recibe la orden de cerrar una botella, el gatillo de la botella seleccionada se activa magnéticamente produciendo el cierre de la misma. La unidad submarina SBE *9plus* estándar consta de una carcasa de aluminio con capacidad de hasta 6800 m de profundidad, que contiene en su interior la electrónica para la adquisición de datos a 24 Hz, los circuitos de telemetría y un sensor de presión *Paroscientific Digiquartz* con compensación de temperatura. En el exterior se instalan de forma modular los sensores de temperatura y conductividad por los cuales pasa un flujo constante de agua de mar controlado por una bomba. En la Tabla 1 se muestran las especificaciones técnicas para los sensores de conductividad, temperatura y presión. La unidad submarina dispone de un total de ocho canales de entrada, lo que nos permite instalar sensores auxiliares (oxígeno disuelto, fluorescencia, PAR, etc.).

TABLA 1  
Especificaciones técnicas de los sensores instalados en la unidad submarina SBE *9plus*.

Sensor	Rango de medida	Precisión inicial	Estabilidad	Resolución a 24 Hz	Tiempo de respuesta
Conductividad	0 – 7 S/m	0.0003 S/m	0.0003 S/m por mes	0.00004 S/m	0.065 segundos
Temperatura	–5 a +35 °C	0.001 °C	0.0002 °C por mes	0.0002 °C	0.065 segundos
Presión	0 a la escala total	0.015% de la escala total	0.02 % de la escala total por año	0.001% de la escala total	0.015 segundos



La unidad de cubierta se encarga de suministrar energía a la unidad submarina a través de un cable electromecánico montado en un chigre. Este cable, además, transmite los datos registrados por la unidad submarina a la unidad de cubierta, desde donde son descodificados y transferidos a un ordenador permitiéndonos el control de la operación y la supervisión de los datos en tiempo presente. La unidad de cubierta puede recibir también otro tipo de datos como por ejemplo, datos del NMEA para la posición GPS o del sensor de PAR en superficie, con el fin de añadirlos a los datos recogidos por el CTD.

### Reactivos u otro material fungible

- Agua destilada para el mantenimiento de la célula de conductividad.
- Grasa de silicona para el aislamiento de los conectores.
- Tapones para proteger las conexiones.
- Bridas y abrazaderas de acero inoxidable para la sujeción de los sensores.
- Tubos de goma para dirigir el flujo de agua.
- Polímetro, soldador, estaño y tubo termorretráctil por si fallara la conexión entre la roseta y el cable electromecánico.
- Repuestos de la bomba, los sensores de temperatura y conductividad y los cables de conexión.

### Descripción de la técnica

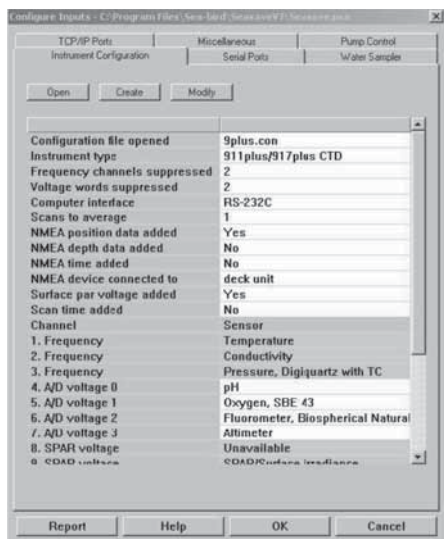
#### *Configuración del software*

Antes de realizar la maniobra de largado del CTD debemos asegurarnos de que el sistema está preparado para recibir datos. La adquisición de los datos del CTD se controla desde el ordenador a través del paquete comercial SEASOFT-WIN 32. Dicho paquete funciona en un entorno Windows y contiene los programas SEATERM, SBEDDataProcessing-Win 32 y Seasave.

El programa SEATERM es una terminal a través de la cual podemos establecer comunicación con la unidad submarina y configurar el sistema.

El programa SBEDDataProcessing-Win32 se utiliza para convertir, editar y procesar los datos mediante diferentes módulos, como se explicará más adelante.

El programa Seasave se utiliza para la adquisición y visualización tanto de los datos que se van registrando en tiempo presente, como de aquellos datos brutos que ya han sido guardados. Además, el programa Seasave nos permite crear el archivo de configuración (\*.con), el cual contiene toda la información de los sensores que se han instalado en el equipo (tipo de sensores, sus coeficientes de calibración y los canales que ocupan). Esta información será usada para transformar los datos brutos que se reciben desde la



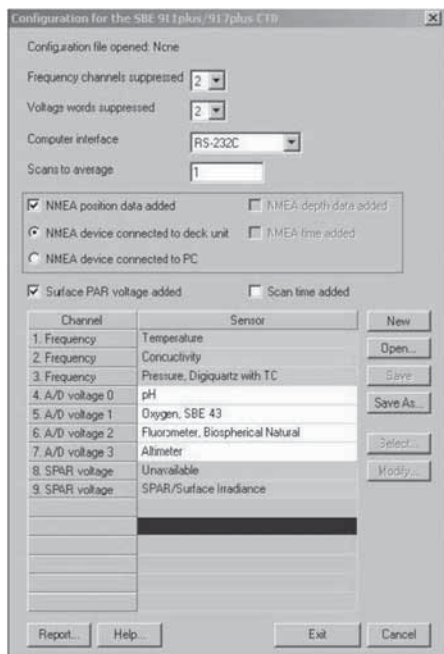
unidad submarina en datos físicos para ser graficados. Seleccionando *Configure Inputs* en el menú aparecerá un cuadro de diálogo como el que sigue en el que podremos abrir, crear o modificar un archivo de configuración.

En caso de crear un nuevo archivo de configuración pulsar *Create* y seleccionar en el cuadro de diálogo que aparece el instrumento deseado.

En caso de abrir o modificar un archivo ya existente, pulsar *Open* y seleccionar el archivo de configuración deseado.

Una vez hecho esto aparecerá el cuadro de diálogo de configuración:

En la parte superior de este cuadro especificaremos el número de canales auxiliares y la inclusión o no del PAR en superficie o del NMEA a los datos del CTD. Seguidamente, se muestra una tabla en la que aparecen las opciones que hemos elegido en la parte superior del cuadro de diálogo. Para cambiar un tipo de sensor o sus correspondientes coeficientes de calibración debemos pulsar sobre el sensor y elegir *Select*. Se abrirá un cuadro de diálogo en el que seleccionaremos el instrumento asociado al canal que hemos elegido. Haciendo un doble clic sobre el sensor que deseemos, podremos cambiar sus coeficientes de calibración, debiendo corresponderse estos con la información actualizada del sensor instalado. Finalmente, guardaremos la configuración generada y nos ofrecerá la opción de obtener un informe de la misma seleccionando *Report*. Nótese que si el archivo de configura-



ción no se corresponde con la configuración actual, el *software* no podrá realizar correctamente la visualización y el procesado de los datos.

En el menú *Configure Inputs* podemos definir además las características de otras configuraciones cambiando de pestaña: *TCP/IP Ports*, *Serial Ports*, *Miscellaneous*, *Pump Control* y *Water Sampler*. En las opciones de la pestaña *Serial Ports* definiremos las características de la comunicación en relación a la versión de *firmware*, el puerto COM mediante el cual se realizará la comunicación con el equipo, la velocidad de transmisión, los bits de datos, la paridad y el modo de comunicación. En el menú *Water Sampler*, configuraremos el proceso de cierre de botellas, el cual puede hacerse de forma secuencial, en el orden elegido por el usuario, en un orden especificado en una tabla o de forma autónoma con presiones predefinidas.

De la misma manera, en el menú *Configure Outputs* podremos definir las características de configuración de salida: *Serial Ports*, *Shared File Output*, *Mark Variables*, *TCP/IP Output*, *TCP/IP Ports*, *SBE 11plus Alarms*, *PC Alarms*, *Diagnostics and Header Form*. En este último podremos establecer las líneas de cabecera que aparecerán en los archivos finales. Hay una cabecera que se añade de forma automática e incluye información acerca de la versión del *software*, los números de serie de los sensores, la configuración del instrumento, la fecha y hora de adquisición de los datos, etc. Además, disponemos de hasta doce líneas para introducir parámetros que consideremos necesarios incluir en los ficheros finales.

Seleccionando *Prompt for Header Information* en *Header choice*, nos aparecerá al inicio de la adquisición de los datos la siguiente pantalla para que la completemos.

El siguiente paso dentro del programa SeaSave consiste en crear un escritorio colocando aquellas ventanas en las que queremos que se visualicen los datos. Se pueden crear tantas ventanas como necesitamos para mostrar tanto los datos que se van adquiriendo en tiempo presente (conductividad, temperatura, presión, etc.) como variables derivadas (salinidad, densidad, etc.). En el menú *Display* nos da la opción de añadir tres tipos de ventanas: *Fixed*, *Scrolled* o *Plot*.

El *Fixed Display* muestra los parámetros seleccionados en filas y sus valores se van actualizando en cada muestreo.

El *Scrolled Display* muestra los parámetros seleccionados en la parte superior y sus correspondientes valores en columnas a medida que se van adquiriendo.

Configure Outputs - C:\Program Files\Sea-Bed\Seasave\VT\Seasave.exe

Serial Data Out | Serial Ports | Shared File Out | Mark Variables | TCP/IP Out | TCP/IP Ports  
 SBE 11plus Alarms | SBE 14 Remote Display | PC Alarms | Header Form | Diagnostics

Header Choice: Prompt for Header Information

Prompt for line # 01: Ship

Prompt for line # 02: Station

Prompt for line # 03: Operator

Prompt for line # 04: Latitude

Prompt for line # 05: Longitude

Prompt for line # 06:

Prompt for line # 07:

Prompt for line # 08:

Prompt for line # 09:

Prompt for line # 10:

Prompt for line # 11:

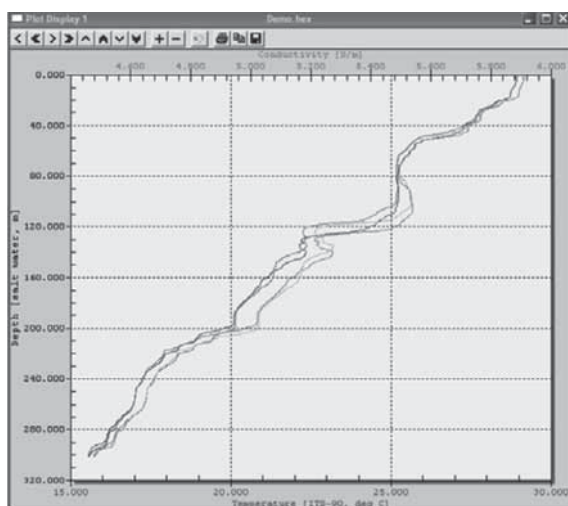
Prompt for line # 12:

Report Help OK Cancel

Fixed Display 1	
Scan Count	5585
Pressure, Strain Gauge [db]	20.0757
Depth [salt water, m]	19.9644
Temperature [ITS-90, deg C]	28.38360
Conductivity [S/m]	5.8534144
Salinity [PSU]	36.32070
Oxygen Saturation, Weiss [ml/l]	4.434398
Oxygen, SBE 43 [% saturation]	96.320496
pH	8.1779
OBS, Seapoint Turbidity [FTU]	0.0381
Fluorescence, Wetlab Wetstar [mg/m <sup>3</sup> ]	0.70629

Scrolled Display 1			
scan	depS M	pr M	t 90 C
5529	30.5558	30.7263	27.70545
5533	29.9757	30.1434	27.75221
5537	29.0979	29.2607	27.74421
5541	28.1472	28.3046	27.75642
5545	27.4729	27.5295	27.78479
5549	26.8593	27.0095	27.80142
5553	25.9785	26.1237	27.35289
5557	25.1098	25.2501	26.04461
5561	24.4446	24.5811	28.11728
5565	23.7399	23.8725	28.15008
5569	22.9168	23.0447	28.21411
5573	22.0633	22.1864	28.25414
5577	21.3829	21.5022	28.28379
5581	20.8240	20.9401	28.32020
5585	19.9644	20.0757	28.36360

Por último, el *Plot Display* nos permite representar hasta 4 variables en el eje x frente a una variable común en el eje y.



El cambio en el contenido de cualquiera de estas ventanas se realiza pulsando el botón derecho del ratón sobre la ventana a modificar. Aparecerá un cuadro de diálogo que nos permitirá cambiar las características que deseemos. Para cambiar el tamaño de las ventanas podemos elegir en el menú *Display* las diferentes opciones de ordenación (*Horizontal tiles*, *Vertical tiles* o *Cascade*) de modo que el Seasave asigna automáticamente un tamaño a cada ventana, o bien podemos personalizarlo pulsando sobre un extremo de la ventana y arrastrando.

Finalmente guardaremos esta configuración en la que hemos incluido toda la información de la configuración de entrada, salida y de visualiza-

ción con extensión \*.psa. Para ello seleccionamos *Save Setup File as* o *Save Setup File* en el menú *File*, dependiendo de si queremos generar un nuevo \*.psa o sobrescribir el actual.

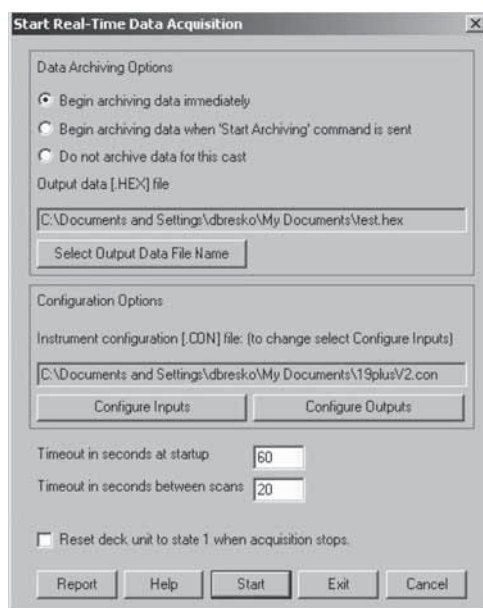
## Adquisición de datos en tiempo presente

Antes de realizar la maniobra de largado del CTD, debemos asegurarnos de que se ha extraído la jeringuilla que hemos usado para inyectar agua destilada en la célula de conductividad y que las botellas se han vaciado y preparado para ser nuevamente disparadas. Una vez que estemos situados en estación, anotaremos en el estadillo el número de estación, posición, hora, información relevante acerca de las condiciones meteorológicas o cualquier incidencia en el largado del equipo. Luego se controla con el chigre la posición de la roseta hasta sumergirla unos 5 metros. Es entonces, cuando encendemos la unidad de cubierta y empezaremos a adquirir los datos. Para ello seleccionamos *Start* en el menú *Real-Time Data*. Aparecerá un cuadro de diálogo en el que especificaremos las características de la adquisición de datos en tiempo presente, tal y como se muestra en esta figura:

En las opciones de grabado de datos debemos seleccionar *Begin archiving data immediately* para que los datos brutos sean grabados en tiempo presente, y la ubicación y nombre del fichero en el que se almacenarán (con extensión \*.dat o \*.hex). En las opciones de configuración deberemos seleccionar el archivo \*.con correspondiente a la configuración que tenemos.

Por último, en la casillas *Timeout in seconds at startup* indicaremos el tiempo permitido antes de recibir el primer dato desde el instrumento y en la de *Timeout in seconds between scans* el tiempo máximo permitido de ausencia de datos después de haber recibido el primer dato desde el instrumento.

Pulsando el botón *Start* aparecerá el cuadro de diálogo de la cabecera en caso de haber indicado que se añadiera. Una vez que lo rellenemos



aparecerán varios cuadros de diálogo informándonos del establecimiento de comunicación con la roseta, la unidad de cubierta y el NMEA.

Antes de que termine la cuenta atrás estas ventanas se cerrarán automáticamente, indicando que existe conexión. En este momento empezaremos a ver los datos recogidos por los sensores en las diferentes ventanas



diseñadas en el archivo \*.psa. Si esto no ocurriese y la adquisición de datos es cancelada, se recomienda consultar el apartado de *Troubleshooting* del manual del SeaSave para estudiar las posibles causas y soluciones.

Antes de empezar el perfil, esperaremos varios minutos (3-5 minutos) con la roseta en superficie para que la bomba empiece a funcionar y los sensores se aclimaten. Paramos la adquisición de datos pulsando *Stop* en el menú *Real Time Data* y reiniciamos el perfil con el mismo nombre para eliminar los datos recogidos durante la estabilización de los sensores. Luego, bajaremos la roseta a una velocidad de aproximadamente 1 metro/segundo hasta la profundidad deseada. Es importante examinar si el perfil de bajada presenta profundidades a las que sea interesante cerrar botellas, como por ejemplo el máximo profundo de fluorescencia o mínimos de oxígeno. En el perfil de subida controlaremos el cierre de botellas a través del cuadro de diálogo que aparece al seleccionar *File Bottle Control* del menú *Real-Time Control*:



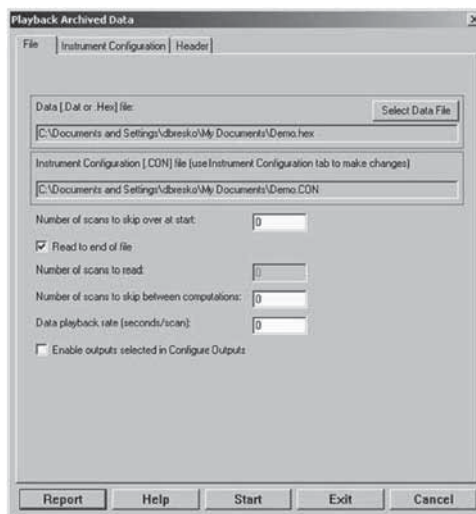
Este cuadro de diálogo variará en función de la opción elegida para el *Water Sampler* en la configuración de entrada. En el caso de haber elegido *Sequential* o *Table driven* nos aparecerá el número de la siguiente botella que se va a cerrar. Sin embargo, si hemos elegido *User Input*, debemos seleccionar la botella que queremos cerrar. Siempre que se alcance la presión de cierre de una botella, detendremos el ascenso de la roseta durante un tiempo prudencial para que se estabilicen los sensores y pulsaremos *Fire Bottle*. Una vez que la roseta regrese a la superficie, pararemos la adquisición de datos pulsando *Stop* en el menú *Real Time Data*.

Se recomienda que al finalizar cada perfil se cambie el permiso de los cuatro ficheros de datos brutos obtenidos para que sean de solo de lectura, se realicen copias de seguridad de los mismos en otras unidades y se inyecte nuevamente agua destilada en la célula de conductividad.



Recordemos que el Seasave también nos permite visualizar datos que ya han sido guardados. Esto lo podemos hacer seleccionando *Start* en el menú *Archived Data*. Aparecerá el siguiente cuadro de diálogo en el que podemos seleccionar el archivo que queremos visualizar y su archivo de configuración correspondiente.

Pulsando *Start* empezará la visualización los datos, la cual puede ser detenida o reanudada a través de las opciones que ofrece el menú de *Archived data*.



## Calibración

Los sensores de conductividad, temperatura y presión son calibrados antes del inicio de la campaña por la compañía SeaBird bajo condiciones físicas totalmente controladas. A partir de estas pruebas se emite un informe con los coeficientes de calibración de cada uno de los sensores, los cuales se especificarán en el archivo de configuración para ser usados en la transformación de datos brutos a datos físicos.

### Calibración del sensor de conductividad con muestras discretas

La celda de conductividad es muy sensible a deposiciones químicas o biológicas, lo que puede ocasionar un cambio en las dimensiones de la celda y por consiguiente una disminución temporal de la precisión del sensor. Por este motivo es de especial relevancia su mantenimiento.

Para un uso continuado del sensor de conductividad se recomienda aclarar minuciosamente con agua dulce, lo que evitará la formación de cristales de sal en la superficie platinizada de los electrodos de la celda de conductividad. Seguiremos el mismo procedimiento para almacenarlo por un largo periodo de tiempo, teniendo especial cuidado en que este quede seco, para evitar la proliferación de organismos, y de colocarlo en sus extremos tubo de Tygon, para evitar que se introduzca cualquier tipo de material que contamine la celda.

A pesar de realizar un buen mantenimiento al sensor de conductividad, este suele sufrir una deriva con el tiempo (es decir, un cambio en la pendiente de calibración, *slope*). Esta deriva normalmente provoca medidas de conductividad hacia valores más bajos. Por otro lado, los errores de *offset* se suelen atribuir a una deriva en la electrónica. Por tanto, la fórmula para la corrección de la conductividad es:

$$\text{Conductividad corregida} = \text{slope} * (\text{conductividad calculada}) + \text{offset}$$

Para sensores calibrados recientemente el *slope* y el *offset* toman valores de 1 y 0, respectivamente.

El *offset* normalmente no supera los  $\pm 0.0001$  S/m por año, por lo que si este alcanzara valores superiores a  $\pm 0.0002$  S/m nos estaría indicando un mal funcionamiento del sensor. En consecuencia, SeaBird recomienda que la corrección de la deriva de la conductividad se realice suponiendo que el *offset* es 0.

El *slope* se puede calcular a partir de las calibraciones hechas antes y después de una campaña o según el análisis de la salinidad de muestras de agua recogidas a diferentes profundidades. Este último método calcula la deriva del sensor de conductividad a partir de las diferencias de salinidad entre las medidas dadas por el CTD, con los coeficientes estimados en la calibración antes de la campaña, y aquellas medidas realizadas directamente sobre una muestra de agua. Habitualmente se asume que las diferencias en salinidad son debidas exclusivamente a un error en conductividad, el cual suele oscilar entre el 70 y 90%. Calculamos la conductividad de las muestras y graficamos frente a la conductividad del CTD para cerciorarnos de que se trata de un cambio en el *slope*. Finalmente calculamos el *slope* como:

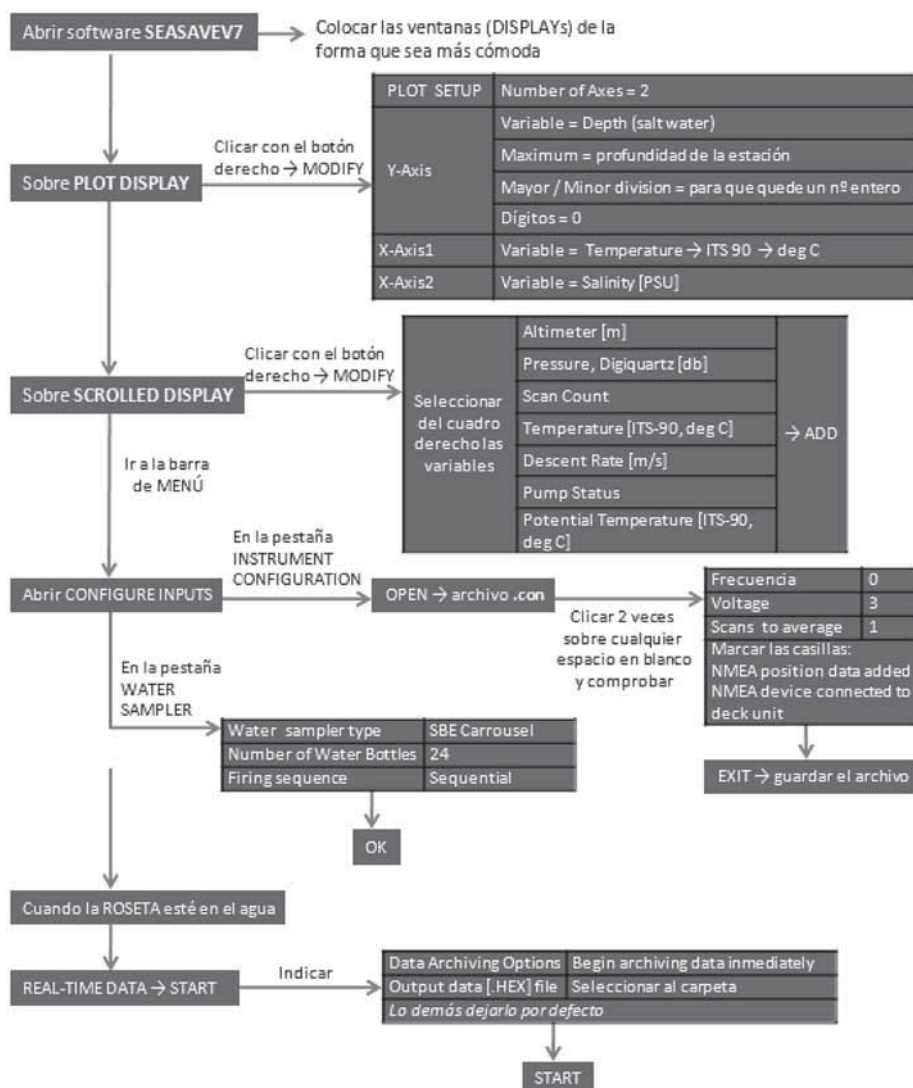
$$\text{slope} = \frac{\sum_{i=1}^n \alpha_i \cdot \beta_i}{\sum_{i=1}^n \alpha_i \cdot \alpha_i}$$

siendo  $\alpha$  la conductividad medida por el CTD,  $\beta$  la conductividad medida en las muestras discretas y el subíndice  $i$  las diferentes profundidades donde se tomaron muestras.

Los datos de conductividad serán recalculados siguiendo los pasos explicados más adelante, añadiendo en el archivo de configuración para el sensor de conductividad la nueva pendiente calculada en la expresión anterior.



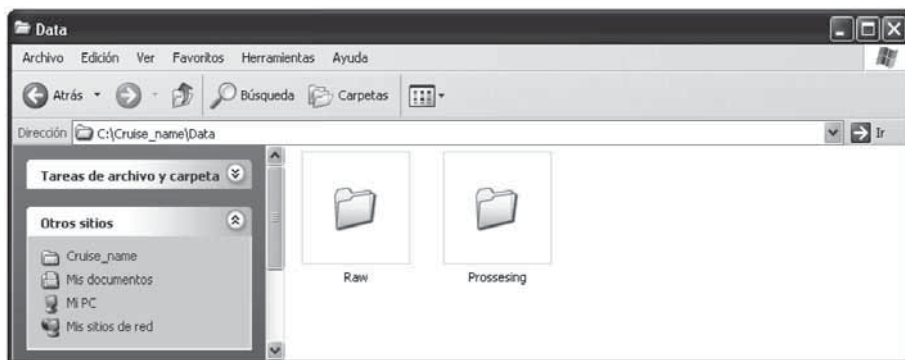
## Cuadro sinóptico de la técnica



## Cálculo de los resultados

En esta sección se explican los pasos a seguir para realizar el procesamiento de los datos del CTD con el programa SBEDataProcessing-Win32.

Generamos una estructura de carpetas que contengan los datos brutos, programas y ficheros auxiliares. En la figura siguiente se muestra dicha estructura, la cual se explica a continuación.



*Nota: evitar que los nombres de carpetas y archivos lleven “ñ”, espacios o guiones medios, ya que complicará su lectura con un lenguaje de programación.*

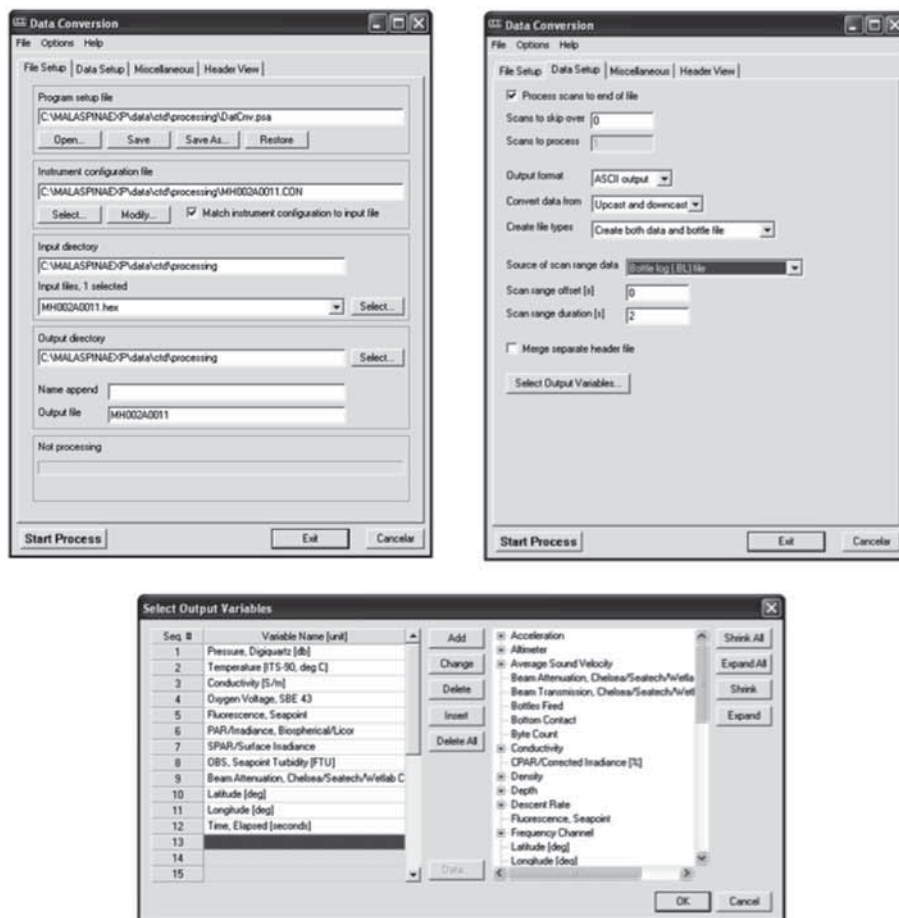
En la carpeta Raw guardaremos todos los datos brutos generados por el CTD. Nótese especial atención que por cada estación realizada existirán 4 tipos de archivos con extensiones \*.hex, \*.con, \*.bl y \*.hdr.

En la carpeta Processing se guardarán solo aquellos archivos de CTD que se deseen procesar. Además esta carpeta siempre debe contener 10 programas \*.psa y 3 archivos de texto:

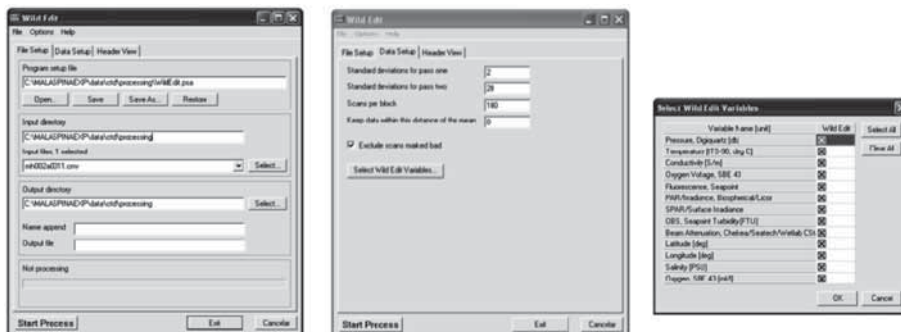
### - Programas \*.psa:

Cada uno de los programas \*.psa modifica los datos y añade información a la cabecera permitiendo el seguimiento del procesamiento realizado en cada una de las variables. Se generarán seleccionando el programa que queremos crear en el menú *Run* del SBEDataProcessing-Win32 y especificando las opciones que nos interesen. A continuación se explica brevemente el objetivo de cada programa y se muestran las opciones que hemos seleccionado.

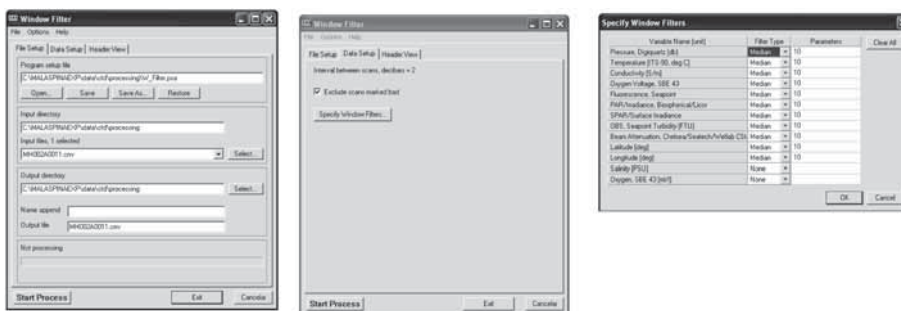
1. *Data Conversion*: convierte los datos brutos a unidades físicas. La aplicación de este programa da como resultado un archivo con extensión \*.cnv que contiene los registros realizados por los sensores durante el perfil, y un archivo con extensión \*.bl que contiene las medidas realizadas en el momento del cierre de las botellas.



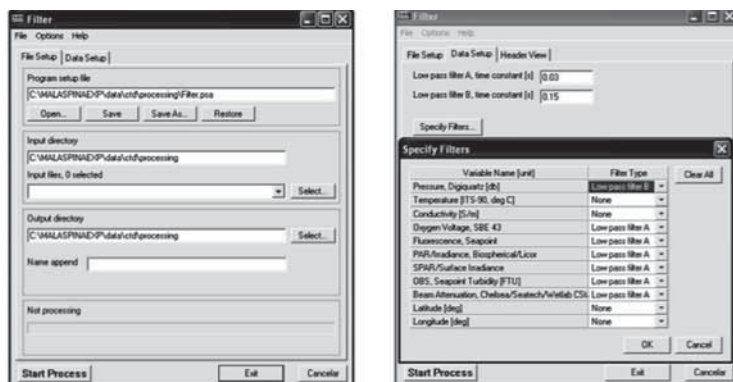
2. *Wildedit*: elimina los valores individuales que son anómalos. La forma de operar del *Wildedit* es calcular la media y la desviación estándar para los datos en un bloque, entendiendo como bloque los datos que especifiquemos en las opciones de este programa. Posteriormente, recalcula la media y la desviación estándar excluyendo temporalmente aquellos valores que difieran de la media por tantas desviaciones estándar como hayamos indicado para el primer pase. Finalmente, asignará el valor de *Badflag* a aquellos datos que superen la media por tantas desviaciones estándar como hayamos indicado en el pase 2.



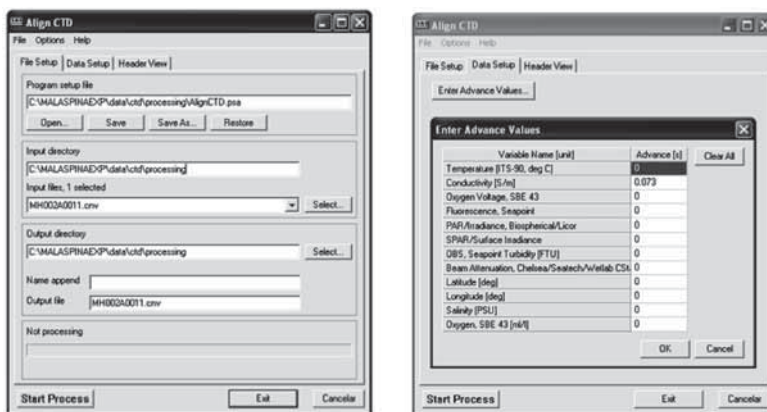
3. *Window Filter*: produce un suavizado de los datos. Para cada variable se puede seleccionar un filtro de tipo boxcar, coseno, gaussiano, mediana, triángulo o ninguno.



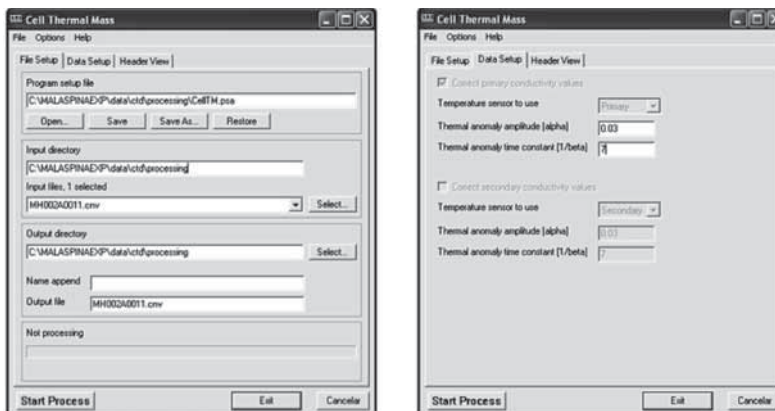
4. *Filter*: aplica un filtro de paso bajo a las variables seleccionadas con el objetivo de suavizar los datos que presentan una frecuencia muy alta. Seabird suministra las constantes recomendadas para cada sensor en función del equipo.



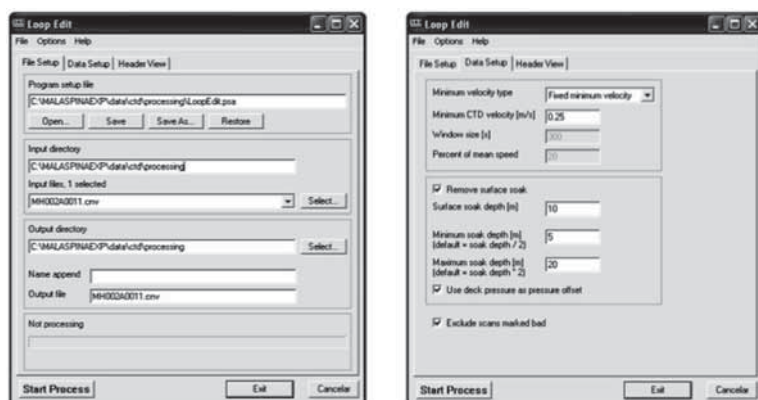
5. *Align CTD*: la colocación no alineada de los sensores, sus diferentes tiempos de respuesta o el tiempo que tarda una parcela de agua en el recorrido a través de los tubos, causa desajustes en las medidas del CTD. Este módulo se encarga de alinear los valores de temperatura, conductividad y oxígeno disuelto respecto de la presión, asegurando que los valores registrados pertenecen a la misma parcela de agua.



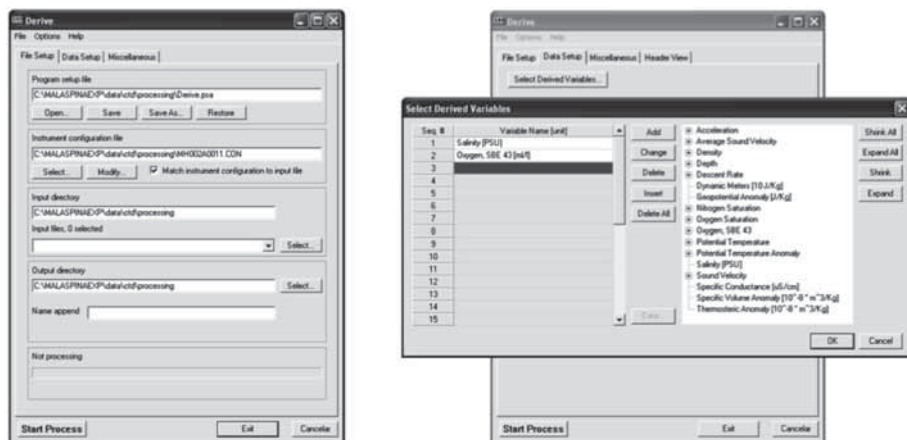
6. *Cell Thermal Mass*: realiza la corrección de las medidas del CTD por anomalías térmicas en la célula de conductividad. Los valores típicos de  $\alpha$  y  $\beta$  recomendados por SeaBird para el SBE 9plus son 0.03 y 7, respectivamente.



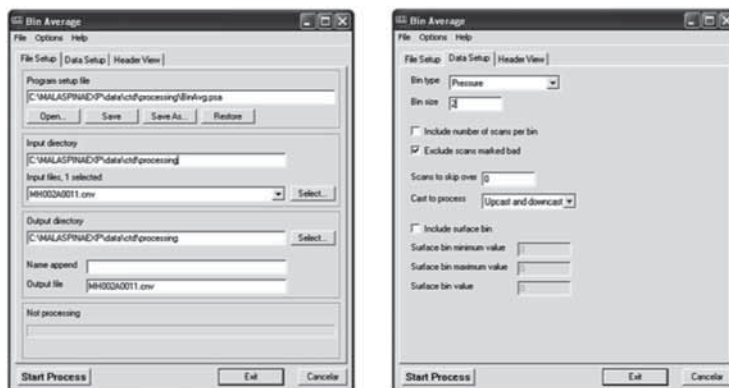
7. *Loop Edit*: marca como *Badflag* aquellos datos que presenten desaceleraciones o inversiones en la presión causadas por el balanceo del barco.



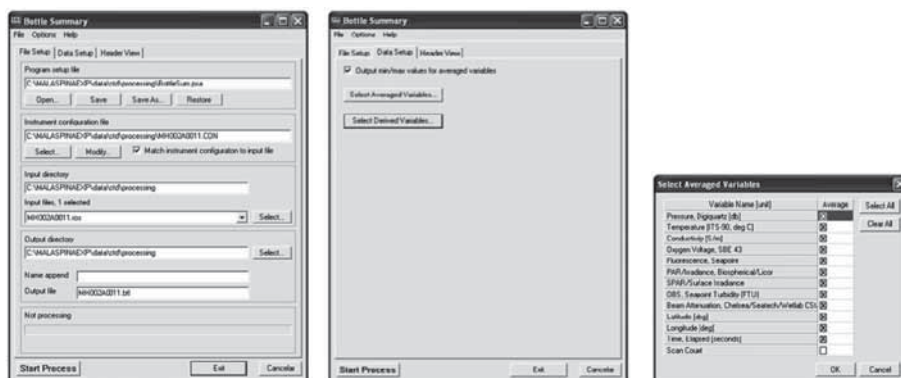
8. *Derive*: usa la presión, conductividad y temperatura contenidas en el archivo \*.cnv para calcular variables derivadas como por ejemplo la salinidad, temperatura potencial, densidad, etc.



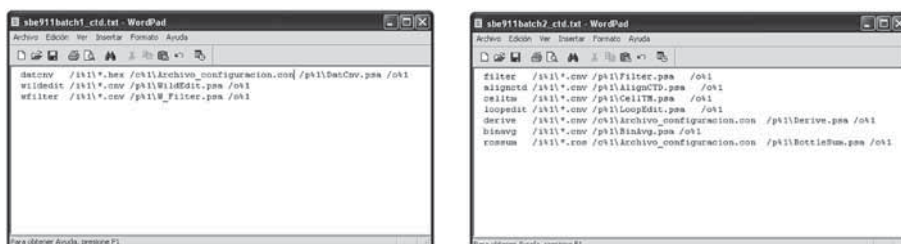
9. *Bin Average*: promedia los datos contenidos en el archivo \*.cnv. Este promedio se puede hacer por presión, profundidad, número de scan o tiempo.



10. *Bottle Summary*: reúne los datos de cierre de botellas que contiene el archivo \*.ros en un archivo con extensión \*.btI.



- **Archivos \*.txt**: son necesarios para automatizar el procesado de los datos con los programas explicados anteriormente. Debemos generar dos archivos de texto que nombraremos como *sbe911batch1\_ctd.txt* y *sbe911batch2\_ctd.txt* y reflejarán la lista de programas \*.psa que deseamos ejecutar, tal y como muestra esta figura:



Por último, debemos generar un archivo, al que llamaremos `sbe911batchLeeME.txt`, que tenga la siguiente estructura:

- 1º El ejecutable (`sbebatch.exe`) con su ruta entre comillas espacio.
- 2º El fichero de comandos con su ruta (sin comillas).
- 3º La ruta de lectura y escritura (sin comillas).



Para ejecutar el primer *batch* debemos copiar la línea del archivo `sbe911batchLeeME.txt` donde aparece dicho *batch*. Pulsamos *Ejecutar* en el menú de *Inicio* del Windows, copiamos la ruta y aceptamos.

Abrimos los archivos `*.cnv` generados y borramos aquellos datos correspondientes al tiempo en que los sensores se estuvieron aclimatando en caso de no haber reiniciado el perfil. Para establecer el inicio del perfil tendremos en cuenta que los datos registrados por los sensores tomen valores aproximadamente constantes y la presión aumenta de forma progresiva.

*NOTA: no eliminar datos en los archivos .hex, ya que el fichero puede quedar corrupto.*

Una vez hecho esto, ejecutamos el batch 2 de la misma forma que lo hicimos para el batch 1.

Recordar que la corrección de la salinidad requiere la repetición de estos pasos utilizando aquel archivo de configuración donde se ha introducido la pendiente de conductividad calculada a partir de la salinidad medida en muestras discretas, según se explicó en secciones anteriores.



## Adquisición y control de datos LADCP

<sup>1</sup>Sánchez, R. F.; <sup>2</sup>Nuez de la Fuente, M.; <sup>1</sup>Benítez Barrios, V. M.; <sup>2</sup>Vélez Belchí, P.;  
<sup>2</sup>López Laatzen, F.; <sup>3</sup>Ruiz Villarreal, M.; <sup>2</sup>Fraile Nuez, E.

<sup>1</sup>C.O. Cádiz, Instituto Español de Oceanografía

<sup>2</sup>C.O. Canarias, Instituto Español de Oceanografía

<sup>3</sup>C.O. A Coruña, Instituto Español de Oceanografía

### Finalidad. Campo de aplicación

El sistema LADCP (Lowered Acoustic Doppler Current Profiler) consiste en uno o más ADCP (perfiladores de corrientes basados en el efecto Doppler) incorporados en el bloque CTD/Roseta para adquirir un perfil de velocidad durante una estación hidrográfica sin prolongar su duración. Es especialmente útil en las estaciones profundas donde otros instrumentos son incapaces de resolver las corrientes, a costa de un esfuerzo operacional relativamente pequeño. Recientemente se han empleado también para estimar la abundancia de zooplancton.

### Equipamiento necesario

El sistema se compone de 2 cabezales ADCP (típicamente Workhorse Monitor de 300 kHz) dispuestos sobre la misma vertical en un lateral de la roseta (Figura 1). Uno de los instrumentos se coloca mirando hacia abajo (*downlooker*) mientras que el otro se orienta hacia arriba (*uplooker*). Para evitar interferencias en las señales el *downlooker* se configura arbitrariamente como MASTER, de forma que este se encarga de sincronizar la emisión de los pings del *uplooker*, el cual actúa como SLAVE. Al estar los instrumentos desligados del cable coaxial es necesario suministrarles alimentación a través de paquetes de baterías externas, también alojadas en la roseta. Se requiere además un cableado específico capaz de suministrar la alimentación desde las baterías, transmitir el ping de sincronización

entre instrumentos y permitir el intercambio de información con el PC de adquisición en cubierta, a través de los terminales de I/O.

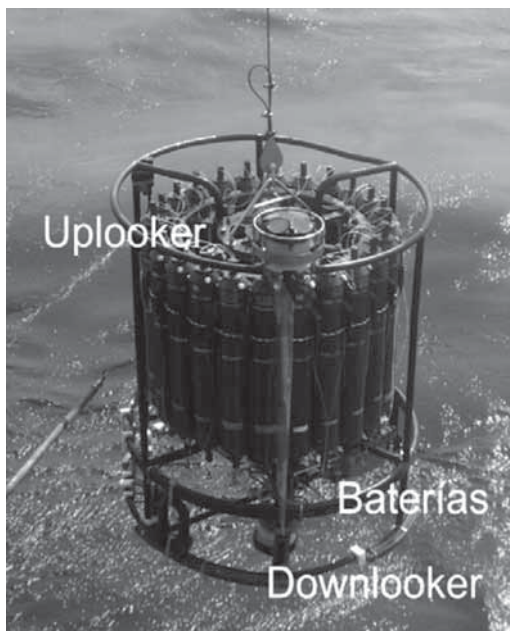


Figura 1. LADCP, disposición de los cabezales ADCP y la batería en la roseta.

## Funcionamiento

El sistema LADCP es un sistema autónomo, lo que quiere decir que una vez iniciada la estación hidrográfica (el *cast*), este adquirirá datos gracias a unas baterías que también deberán ser montadas en la roseta. Nótese que esto es lo contrario al sistema CTD + botellas, las cuales son controladas y alimentadas con corriente desde el barco mediante el ordenador y/o unidad de superficie SBE 11 plus CTD Deck Unit.

## Montaje

El procedimiento detallado para el montaje viene ilustrado en las siguientes figuras. El *uplooker*, que hará de SLAVE, se coloca orientado hacia arriba mientras que el *downlooker* o MASTER se orienta hacia abajo (Figura 2). Los instrumentos se colocan de forma que se minimicen las interferencias con la estructura de la roseta, por lo que deberemos intentar librar los elementos metálicos de la misma. Los transductores son delicados, por lo que se recomienda colocar elementos de *foam* (por ejemplo los que vienen con la caja de ADCP) mientras se coloca el *downlooker*.

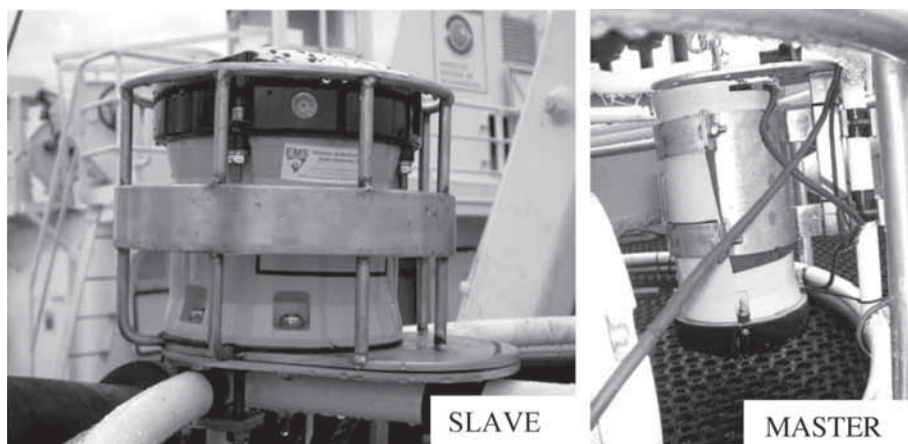


Figura 2. Detalle de los anclajes y colocación de los instrumentos en la roseta.

Las piezas de anclaje a la roseta normalmente estarán ya colocadas. Si se hubiesen desmontado las sujeciones hay que recordar que ambos instrumentos deben coincidir en la vertical, tal y como se muestra en la Figura 3:

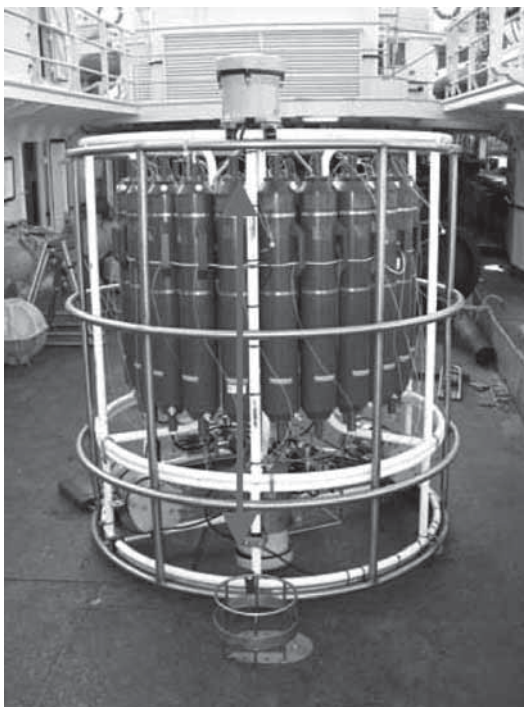


Figura 3. Los cabezales deben alinearse en la vertical a lo largo del lateral de la roseta.

La distribución de estas piezas es simple. En todos los casos cuentan con tres puntos de unión a la estructura de la roseta, consistentes en pares de espigas que con una horquilla y tuercas amordazan los tubos de la roseta. El *downlooker* y las cajas estancas de baterías van sujetos a estas estructuras con unas abrazaderas. El SLAVE descansa en una jaula, no tiene abrazaderas para fijarlo. Una placa constituye el anclaje, y cuenta con cuatro agujeros que coinciden con los de la caja estanca del instrumento. Entre el ADCP y el anclaje se colocara la protección y una lámina de neopreno. Todo se asegura bien con tornillos pasantes. En este momento, es bueno intentar que MASTER y SLAVE queden alineados tomando como referencia el beam 3 que tiene un puntito al lado del haz y teniendo en cuenta que el SLAVE queda fijo y el MASTER el que se gira. Como se indica después, una vez hecho el cableado se puede realizar una comprobación con un perfil en seco.

ES IMPORTANTE QUE ENTRE TODAS LAS SUPERFICIES DE CONTACTO ENTRE LAS CAJAS ESTANCAS Y LAS ESTRUCTURAS DE ANCLAJE SE COLOQUE UNA LÁMINA DE NEOPRENO DE 5 mm DE ESPESOR. Esto afianza la sujeción y asegura el correcto funcionamiento de los instrumentos acústicos. Para facilitar el montaje es recomendable sujetar cada una de las láminas a las abrazaderas de acero con una cinta adhesiva (americana o aislante). Es importante colocar la tapa al transductor para evitar la incidencia de la radiación solar sobre el uretano que recubre los haces del transductor.

Para las baterías existen al menos dos configuraciones. La clásica es la que emplea los contenedores de baterías RDI (Figura 4). Una configuración alternativa la proporciona el empleo de baterías recargables (Figura 5). Para el primer caso, cuando tratamos con una roseta suplementada las sujeciones o ‘cunas’ de las baterías se colocan en la base, sobre el aro inferior y la barra que lo atraviesa diametralmente. Con objeto de equilibrar el equipo, se coloca cada una a ambos los lados, como se muestra en la Figura 4.

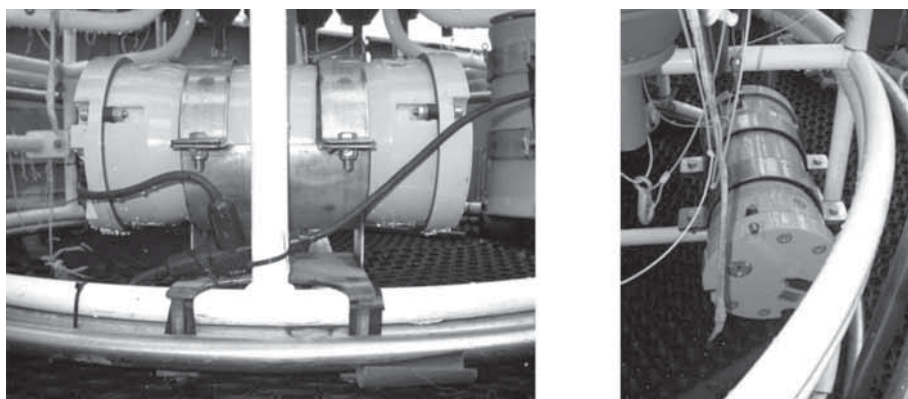


Figura 4. Detalle de la colocación de los paquetes de baterías de TRDI en la base de la roseta.

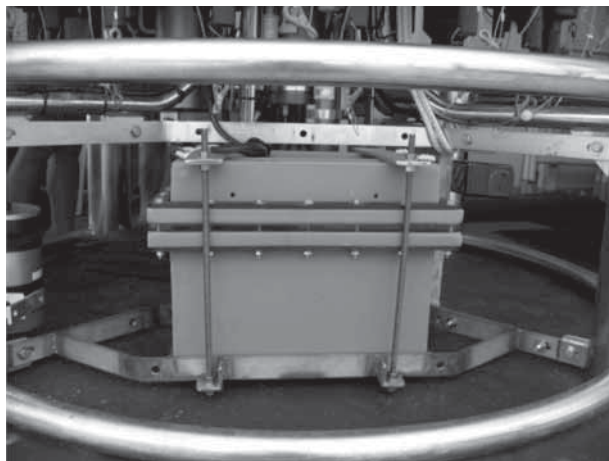


Figura 5. Imagen de una S.O.B. (*safe orange battery*, tomada de [http://currents.soest.hawaii.edu/docs/ladcp\\_doc/Hardware/Install/rosette/sob\\_pmel.png](http://currents.soest.hawaii.edu/docs/ladcp_doc/Hardware/Install/rosette/sob_pmel.png)).

El segundo caso consiste en una estructura plástica, abierta en un extremo y que contiene una cámara flexible de uretano rellena de aceite dentro de la cual se aloja un sistema de baterías recargables convencionales (Figura 5). La membrana dispone de una válvula de seguridad para el escape de gases generados durante la recarga. Se coloca sobre el extremo inferior de la roseta, ajustada con abrazaderas o a alguna estructura.

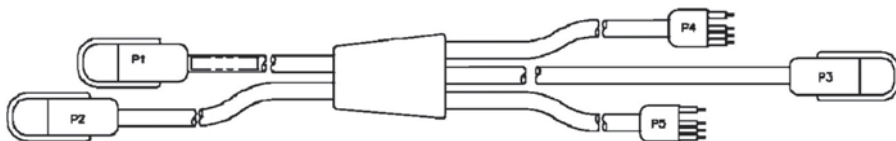
Una vez acabado el montaje de los instrumentos tenemos que verificar el equilibrado de la roseta. Esto se debería conseguir con la correcta distribución de unos contrapesos de plomo a lo largo del aro inferior de la estructura. En segundo lugar es importante que los ADCPs estén alineados. La orientación (*heading*) debe ser la misma para los dos instrumentos, contando con un punto al lado del transductor Nº 3 (norte del instrumento) como referencia. Para verificar la correcta alineación se recomienda hacer perfiles en seco e inspeccionarlos rápidamente con WinADCP para comprobar en la tabla generada que la orientación (en grados) es la misma para los dos instrumentos.

## Conexión del sistema LADCP

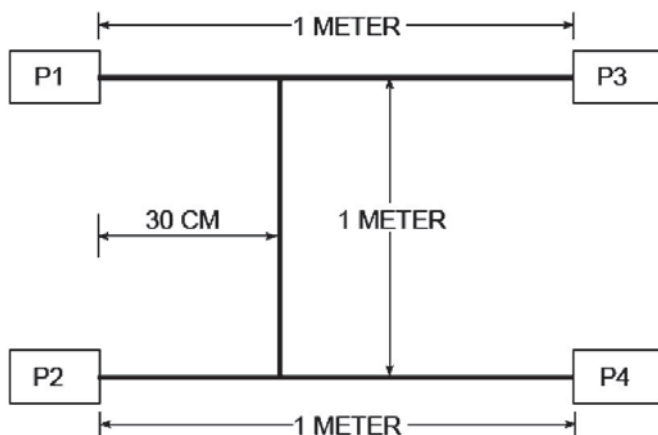
Para el conexión del sistema existen varias modalidades. En todos los casos la finalidad es suministrar el voltaje a los instrumentos, permitir el intercambio de información entre aparatos para la sincronización de *pings* y proporcionar el acceso desde el PC a través del I/O. Vamos a ver tres configuraciones posibles. Las dos primeras (clásicas) emplean los paquetes

de baterías originales RDI. La última hace referencia al empleo de la SOB. En las configuraciones clásicas hacen falta 4 tipos de cables:

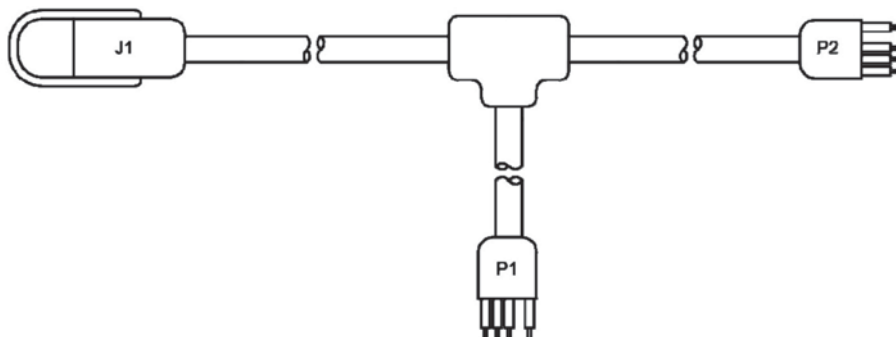
– cable estrella / *star cable*:



– cable LADCP en X / “X” cable:



– cable C2 en “Y” / “Y” cable, del tipo y cantidad de conectores que se muestran a continuación:



En los extremos que conectamos al ordenador de los cables “alargador” *I/O Cable*, habrá un cable colgando que tendrá en su extremo un conector redondo tipo rosca. Este conector es una toma de corriente que “enrosca-



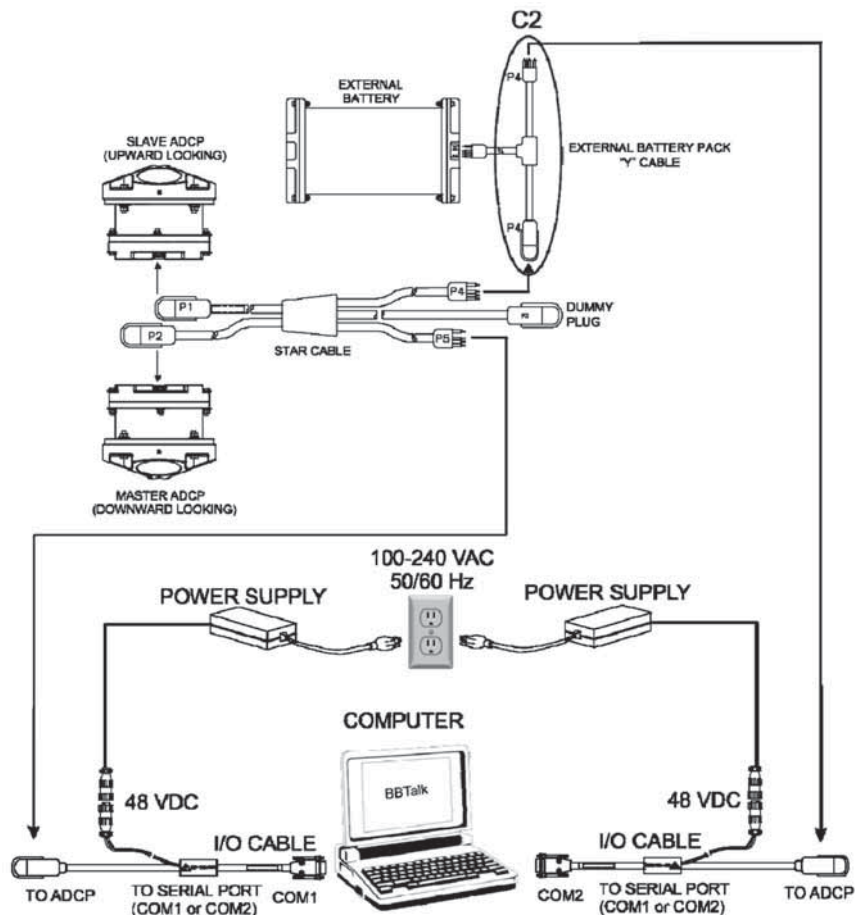


Figura 6. Conexiones de un LADCP con un cable en estrella. Tomado de TRDI (2007).

remos” en su conector opuesto del adaptador de corriente que viene en el pack del LADCP. Esto se hace con ambos cables que van a los pines P4 y P5. Las fuentes de alimentación estarán conectadas siempre para el caso que nos concierne.

### *Configuración clásica con dos paquetes de baterías*

Aquí enlazamos ambos instrumentos con el cable LADCP en X, mientras que usamos dos cables en T tipo C2/C3 para ligar cada ADCP con su correspondiente paquete de baterías el terminal de I/O. El esquema es el que indica la Figura 7.



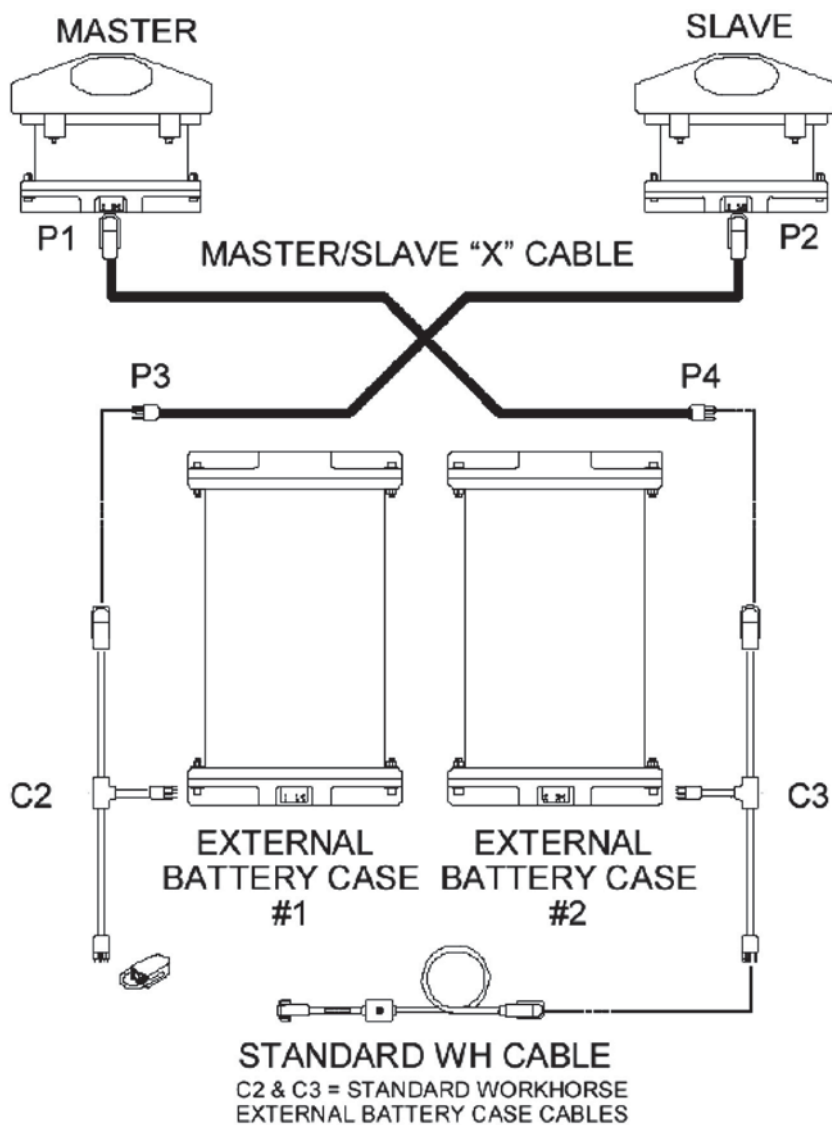


Figura 7. Conexiones de un LADCP con un cable en X. Tomado de TRDI (2007), página 27.

### Configuración con una S.O.B.

En el caso de emplear una S.O.B. el esquema es análogo a la primera configuración, que se ilustra a continuación. Los terminales P1 y P2 del cable estrella (hembras) se utilizan para enlazar ambos instrumentos, P4 y P5 (machos) para proporcionar acceso a los cables I/O y el P3 (hembra) para enganchar con la batería. En el esquema de la Figura 8 se ilustra la disposición de los cables. En este caso particular se incluyen latiguillos o prolongadores C1, C2, C3 y C5 para evitar daños sobre el cable estrella (C0 en la figura). C4 hace referencia a los cables I/O.

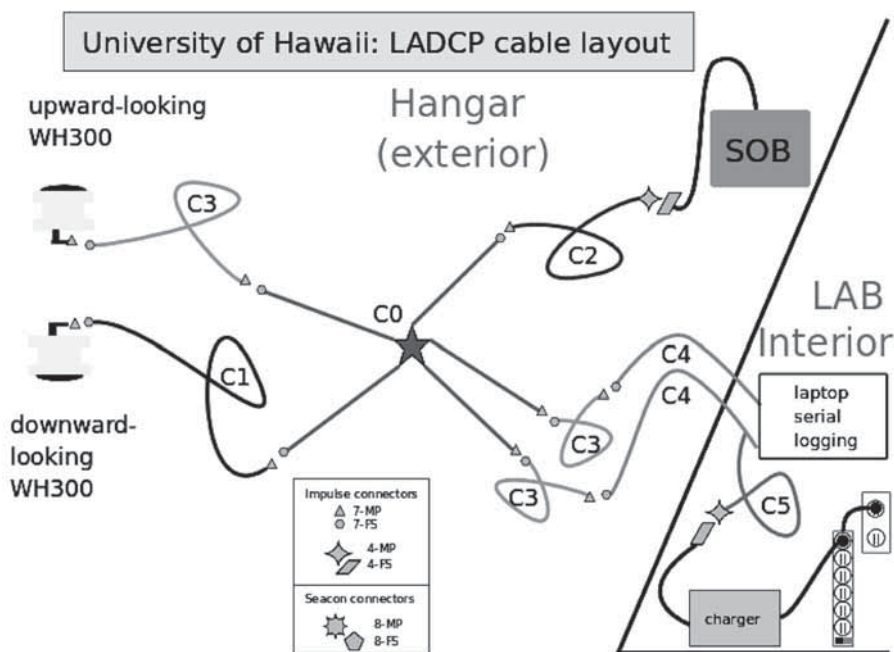


Figura 8. Diagrama de la configuración con un cable en estrella y una S.O.B. Tomado de: [http://currents.soest.hawaii.edu/docs/ladcp\\_doc/Hardware/Ladcp/technotes/star\\_cable.png](http://currents.soest.hawaii.edu/docs/ladcp_doc/Hardware/Ladcp/technotes/star_cable.png).

Los cables se aseguran a la estructura teniendo en cuenta no formar fuertes curvaturas ni producir ligaduras tensas que comprometan, con el uso prolongado, la vida útil del cable. Es recomendable emplear latiguillos o prolongaciones para que las tensiones y torsiones se produzcan sobre estos en lugar de los conectores de los cables estrella y en “Y” (Figura 9). Los extremos de los accesos a los terminales de I/O y al cargador de batería para el caso de emplear la S.O.B. deben quedar sujetos al armazón pero de forma que sean accesibles a los operadores de los instrumentos. Durante el

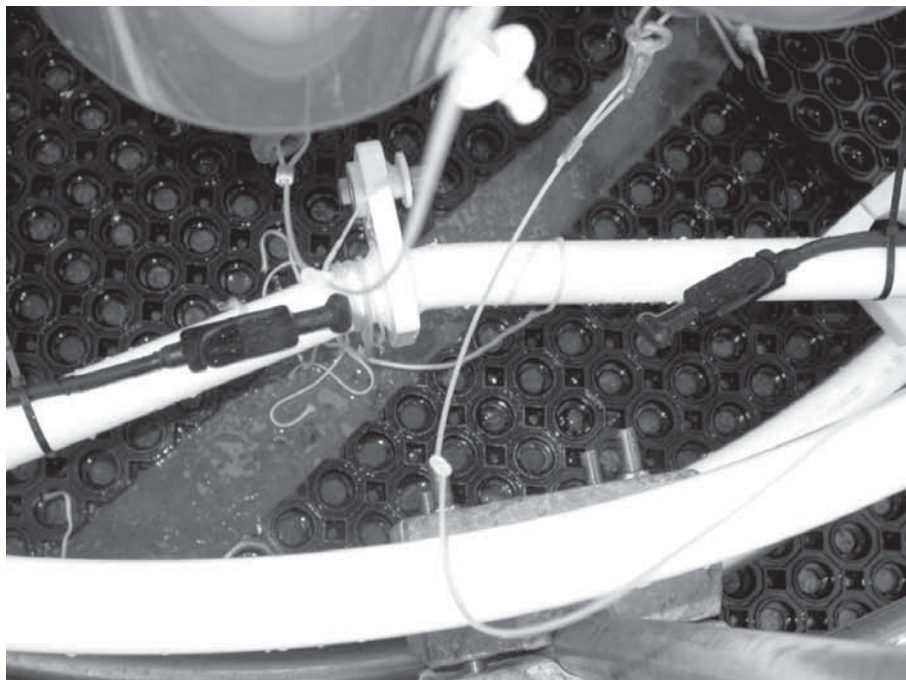


Figura 9. Detalle de la sujeción de los terminales de los conectores en el interior de la roseta.

largado los conectores deben sellarse con sus correspondientes conectores ciegos.

Los conectores rectangulares de 7 pines (IMPULSE PLPMIL7-FS y MP) empleados para los WH300 con protocolo RS232 son extremadamente delicados. Es fundamental sujetar el terminal, no el cable mientras se conectan los conectores. Normalmente no es necesario forzar; en caso de dificultad habrá que emplear grasa de silicona u otro lubricante hidrófobo. Evitar en la medida de lo posible las torsiones y tensiones sobre los terminales. Giros y tirones causan frecuentemente roturas en las conexiones internas de los conectores, debilita el aislante y puede ser la causa de cortos y malas conexiones.

EL cable LADCP I/O debe mantenerse en todo momento limpio de pelusas e impurezas y seco. Idealmente habrá que limpiar y secar los conectores con toallitas tipo KimWipes si vemos restos de agua. En cualquier caso la conexión habrá que realizarla siempre después de haber cortado la fuente de alimentación para evitar cortos en caso de una conexión accidental y para minimizar el riesgo de corrosión en caso de haber salpicado alguno de los pines con agua de mar.

## Material fungible

El sistema LADCP es un sistema autónomo que adquiere datos gracias a llevar incorporado en la roseta unas baterías. Habrá que cerciorarse de que las baterías están cargadas. Como elementos fungibles necesitaremos baterías de repuesto en caso de agotamiento de las no recargables o malfuncionamiento de las recargables.

## Descripción de la técnica

Adquirir datos de LADCP durante un perfil de CTD requiere la sincronización del reloj interno de los ADCP y su programación para el tipo de adquisición, entre la cual se incluye la orden de arranque y sincronización con la pareja. La comunicación se realiza a través de un cable por el puerto serie. Podemos emplear una batería recargable o paquetes desechables para alimentar los ADCP. Cuando el CTD/roseta está preparado para largar, debemos quitar las tapas de los transductores, desconectar los cables y colocar los conectores ciegos en los terminales. Posteriormente la roseta realiza el perfil de bajada y subida con los instrumentos adquiriendo datos, tras lo cual una vez a bordo y asegurada, se vuelven a conectar los cables, se interrumpe la adquisición de datos y se descargan al ordenador de cubierta.

## Protocolo de largado y recuperación de LADCP

**Largado:** mientras el barco se aproxima a la estación para la realización de un perfil de CTD debemos asegurarnos de tener los instrumentos preparados y en funcionamiento, con los cables desconectados y los tapones ciegos en los respectivos terminales. Esto debería ocurrir con el tiempo suficiente como para no interferir en la maniobra de largado de la roseta.

En detalle:

- Unos 10 minutos antes de la estación cubrimos el correspondiente estadiillo de operaciones.
- Iniciamos la adquisición de datos y anotamos la hora.
- Desconectamos la fuente de alimentación y/o carga de la batería.
- Desconectamos los cables y colocamos los tapones ciegos.
- Aseguramos los cables de I/O a alguna sujeción en el hangar de la roseta.
- Retiramos la tapa protectora de los ADCP.

El ADCP está preparado para largar.

**Recuperación:** una vez se asegura la roseta a bordo y se cierran los portales de cubierta se colocan inmediatamente los cables de I/O y carga de la batería (si es necesario).

- Endulzar los conectores y secar.
- Quitar los *dummies* y eliminar los restos de agua con un KimWipe o similar.
- Conectar los cables de alimentación y I/O a los instrumentos.
- Asegurar los cables a la roseta con un pulpo o similar, de forma que no se incomoden las maniobras de muestreo de la roseta.
- Descargar los datos. Puede demorar bastante, por lo que se puede colaborar en las labores de muestreo y la toma de agua para análisis de salinidad.
- Si se está recargando la batería, chequear el cargador y desconectarla cuando esté lista.

### MASTER / SLAVE: comunicación y puesta en funcionamiento

Existen varias herramientas para comunicarse con el LADCP. En el presente manual se ilustra el funcionamiento a partir de los programas suministrados por el fabricante T-RDI. Para otras opciones el lector puede visitar <http://currents.soest.hawaii.edu/> o <http://www.ldeo.columbia.edu/~ant/>.

Para conectar y programar los equipos con el PC tenemos que haber instalado todo el *software* de manejo (**WinADCP**, **PlanADCP**, **RDITools**). Es interesante disponer de la documentación de comandos avanzados de RDI (Workhorse Expert Command Guide en [http://www.rdinstruments.com/cc\\_documents.html](http://www.rdinstruments.com/cc_documents.html)).

Una vez se han introducido todos los parámetros para que el ADCP pueda trabajar correctamente en cada perfil, el proceso es mecánico:

Picamos acceso directo a **BBTalk** (esta es una herramienta de **RDITools**, Figura 10).

- Connect To: Device: WorkHorse y COM Port: COM1/COM2. (El número de puerto COMx depende de la configuración/autodetección de la tarjeta o los adaptadores USB. En caso de duda se puede correr el Autodetect ADCP).
- Port Settings: Baud Rate: 9200; Parity: None; Stop Bits: 1; Flow Control: 1.
- Send Break On New Connection: activado; Send CK On Baud Rate Change (CB Command): activado.
- Finish.

En la consola debe aparecer el siguiente mensaje:

```
[BREAK Wakeup A]
WorkHorse Broadband ADCP Version 16.30
Teledyne RD Instruments (c) 1996-2007
All Rights Reserved.
```

Esperamos el mensaje de conexión en el que nos aparece la verificación de la misma. En caso de que no se produzca la conexión pulsamos sobre el icono B de la barra de herramientas (*send break*; manualmente se

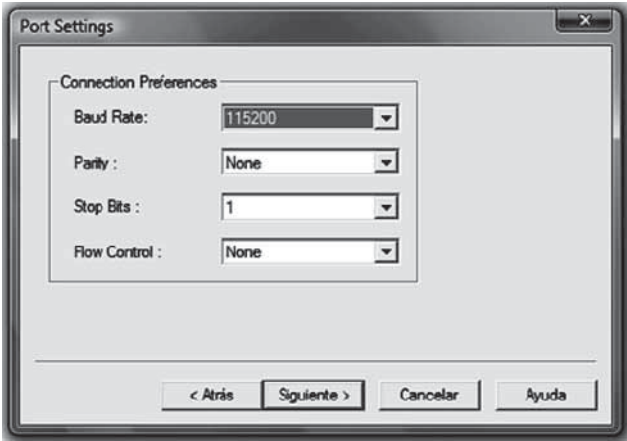


Figura 10. Pantalla de configuración de los parámetros de comunicación del ADCP.

puede hacer pulsando la tecla **Fin**, o **End**) y esperamos la conexión; si continua el problema activamos el icono que está al lado del anterior (en él aparece una mano señalando con un dedo sobre una hoja escrita) y pulsamos **AutoDetectADCP**. Si no se consigue solucionar el problema habrá que buscarlo en otra parte del equipo o instalación.

En modo terminal (**BBTalk**) debemos ejecutar el comando **OL<ENTER>** para comprobar la configuración. Este comando proporciona un listado de las *upgrades* o mejoras del *firmware*. Principalmente debemos comprobar la instalación del modo LADCP y rastreo de fondo (Bottom-track, BT). Para el correcto funcionamiento es recomendable que el módulo LADCP esté activo en ambos instrumentos y el BT lo esté al menos en el *downlooker*. Un ejemplo:

>ol

FEATURES	
Feature	Installed
Bottom Track	Yes
Water Profile	Yes
High Resolution Water Modes	No
Lowered ADCP	Yes
Wave Gauge Acquisition	No
Shallow Bottom Mode	No
High Rate Pinging	No
See your technical manual or contact RDI for information on how to install additional capability in your WorkHorse.	

## Configuración de los instrumentos

En configuración Dual, los instrumentos deben estar conectados en modo MASTER/SLAVE, de forma que el primero coordine la emisión de los pings para evitar interferencias entre ambos. Este intercambio de información se realiza a través del protocolo RS485 y a 9600 bd. Por lo tanto es EXTREMADAMENTE IMPORTANTE que en el momento de comenzar el perfil ambos instrumentos estén configurados a 9600 bd. En caso contrario no se puede asegurar la sincronización.

En cada perfil se transmiten los parámetros de configuración a cada uno de los instrumentos en forma de comandos. El tipo y calidad de los resultados depende de la configuración. Estos comandos se transmiten al instrumento a través de **deployment\_command\_files**, que se ejecutan mediante el F2 una vez conectado el instrumento. La sintaxis y comandos disponibles dependen del tipo de instrumento y de la versión de *firmware* instalada. Estos vienen definidos en un fichero ASCII plano. Típicamente debemos tener dos ficheros en los que podemos especificar el intervalo de emisión de pulsos, el retraso en la sincronización de MASTER/SLAVE, el tamaño y número de celdas (*bins*), los filtros para *outliers*, etc.

A partir de la versión de *firmware* v16.30 en los WH300kHz son necesarios algunos cambios:

- **WM15** para activar el modo LADCP (no son necesarios los comandos L).
- No es necesario incluir comandos que reafirman los valores por defecto (EA, ES...).
- Almacenar los datos en coordenadas no geográficas (a lo largo de haces o *beams*) para resolver soluciones a 3 haces y una mejor inspección de los valores.
- Staggered single-ping ensembles every 1.2 s (muestreo a intervalos).
- 20 bins de 8 m para un rango de 160 m (quizá menos para casts profundos).

**Valores por defecto de fábrica:** para asegurar que siempre partimos de la misma configuración conviene resetear los valores por defecto (CR1).

**Tamaño de celda (*bin*) y (duración del) pulso:** el tamaño de celda puede o no coincidir con el tamaño del pulso. Podemos reducir cada uno de ellos (o ambos) para aumentar la resolución vertical, a expensas de reducir el alcance (*range*) y la exactitud, que son esenciales para la calidad de los datos de LADCP. Para perfiles oceánicos podemos usar valores de 8-10 m para ambos (WS0800; la duración del pulso se ajusta automáticamente a esta —WT0000, valor por defecto—, o manualmente con WTxxxx).

**Número de celdas:** debemos ajustarlo aproximadamente al alcance aproximado. Un valor demasiado bajo nos hace perder datos. Un valor demasiado elevado aumenta el tamaño del fichero y el tiempo de descarga. Además también podría reducir la intensidad de emisión de pulsos (*ping*



*rate*). Para un instrumento de 300 kHz podemos ajustar las celdas para un alcance de 160 m (WN020), aunque podríamos reducirlo para estaciones muy costeras.

**Tamaño del ensemble (*pings* a promediar):** conviene almacenar ensembles con pings individuales para tener la máxima flexibilidad a la hora de editar (WP1).

**Blanqueo cerca del instrumento (*blank after transmit*, BAT):** este parámetro define la distancia entre el ADCP y la celda más próxima al instrumento. Si esta es muy pequeña (medimos velocidades demasiado próximas al transductor), podemos contaminar la señal con reverberaciones. RDI recomienda de forma genérica utilizar media longitud del pulso, aunque esta es demasiado corta para las aplicaciones LADCP. En este caso debemos poner una distancia mínima (p. ej. WF0176). Nuestra preferencia es minimizar el BAT (WF0000) y luego eliminar el (los) bin(s) más próximo(s) en el post-proceso.

**Sistema vertical de coordenadas:** existen 2 esquemas: 1) las velocidades proporcionadas por cada uno de los haces se almacenan en bruto (coordenadas de haces (*beams*) o propias del instrumento y 2) coordenadas cartesianas terrestres (componentes zonal y meridional). Se recomienda emplear el primer sistema porque permite mayor exactitud y flexibilidad en el post-proceso. El segundo esquema es necesario cuando no empleemos ensembles de múltiples pings.

**Intensidad de muestreo (*sampling rate*):** en principio el ADCP debería pingar lo más rápido posible para maximizar el número de muestras y por tanto minimizar el error estándar de las velocidades, aunque en la práctica esto no es así. En cambio, sí que se verifica la idoneidad del uso de muestreo variable a intervalos (*staggered pinging*) frente a interferencias, por ejemplo. Para esquemas duales (WH 300 kHz) el muestreo a intervalos variables de 1.5-2 s es adecuado.

**Rastreo de fondo (*bottom tracking*, BT):** este permite proporcionar condiciones de contorno en el fondo para invertir las velocidades de LADCP. RDI utiliza *pings* dedicados para el BT de alta calidad, en medio de los pings perfiladores. No está clara la ventaja de aplicar el BT dedicado de RDI, ya que revierte en una menor intensidad de muestreo de la columna de agua. Además, es posible sacar información a partir del post-proceso de los perfiles convencionales, aunque a un alcance bastante reducido.

**Emisión sincronizada de *pings*:** al emplear 2 instrumentos para perfilar con LADCP, estos deben estar sincronizados o muestrear a intervalos diferentes para evitar interferencias. En el primer caso, cualquiera de los dos instrumentos puede ser el master, aunque es común usar el *downlooker*.

**Alcance del instrumento (*range*):** este es uno de los parámetros fundamentales en la calidad de los perfiles de LADCP. Si hay posibilidad de ello, los instrumentos deberían ser configurados para el máximo alcance. En



particular, los instrumentos de RDI (*broadband*) permiten, en función del ancho de banda, un modo de configuración que proporciona un pulso con el ancho de banda más estrecho, y permite un incremento del 10% en el rango a expensas del incremento en la desviación estándar (modo 1, **LW1**). En teoría, deberían mejorarse las mediciones al obtener celdas con menor error a expensas del alcance. Sin embargo, los técnicos del SOC han verificado en multitud de ocasiones la idoneidad de emplear el modo 1.

**Velocidad de ambigüedad:** este valor debe ser algo superior a la mayor velocidad esperada a lo largo de cada uno de los haces, aproximadamente la velocidad de largado/virado más el balance del barco. Aumentar este valor disminuye la exactitud de los datos.

La configuración más reciente es la siguiente: Downlooker/Master:

WM15 ; activates LADCP mode (BT from WT pings)  
 CF11101 ; Flow control  
 EX00100 ; coordinate transformation:  
 EZ0011101 ; Sensor source:  
 TC2 ; staggered ping-cycle, ensembles per burst  
 WP1 ; pings per ensemble  
 TB 00:00:01.20 ; time per burst  
 TE00000100 ; Set one ensemble/sec  
 TP000100 ; Set one second between pings  
 WN020 ; set no of bins  
 WS0800 ; bin length [cm]  
 WF0176 ; blank after transmit [cm]  
 LW1 ; Set ADCP to narrow bandwidth and extend range by 10%  
 WV250 ; ambiguity velocity [cm]  
 LZ30,220 ; amplitude and correlation thresholds for bottom detection  
 SM1 ; set master  
 SA001 ; TRANSMITS SYNCHRONIZING PULSE BEFORE EACH WATER  
 PING  
 SW05500 ; wait .5500 s after sending sync pulse  
 SIO ; # of ensembles to wait before sending sync pulse: SYNCHRONIZ-  
 ING PULSE SENT ON EVERY PING  
 RN M0908 ; Name data file

La configuración más reciente es la siguiente: Uplooker/Slave:

WM15 ; activates LADCP mode (BT from WT pings)  
 CF11101 ; Flow control:  
 EX00100 ; coordinate transformation:  
 EZ0011101 ; Sensor source:  
 WP1 ; pings per ensemble  
 TE00000000 ; Set 0 ensemble/sec (slave)  
 TP000000 ; Set 0 seconds between pings (waits for an order)

WN020 ; set no of bins  
 WS0800 ; bin length [cm]  
 WF0176 ; blank after transmit [cm]  
 LW1 ; Set ADCP to narrow bandwidth and extend range by 10%  
 WV250 ; ambiguity velocity [cm]  
 LZ30,220 ; amplitude and correlation thresholds for bottom detection  
 SM2 ; set slave  
 SA011 ; LISTENS FOR SYNCHRONIZING PULSE BEFORE EACH PING  
 ST0300 ; WAIT UP TO 300 SECONDS FOR SYNCHRONIZING PULSE  
 SW05500 ; wait .5500 s after sending sync pulse  
 SIO ; # of ensembles to wait before sending sync pulse: SYNCHRONIZ-  
 ING PULSE SENT ON EVERY PING  
 RN S0908 ; Name data file

### *Explicaciones:*

**WM15:** Activa el modo LADCP; de otra forma tenemos el modo perfilador convencional.

**CF11101:** Control del flujo de datos:

- forma un nuevo ensemble cuando esté preparado (automático)
- realiza un ping cuando esté preparado (automático)
- formato de salida binario
- deshabilita la salida en serie
- habilita el datalogger

**EX00100:** Transformación de coordenadas:

- coordenadas radiales a lo largo de los haces (2 bits)
- emplea pitch/roll
- deshabilita soluciones en 3 haces
- no bin mapping

**EZ0011101:** Fuente del sensor:

- velocidad del sonido manual (EC)
- profundidad del transductor manual (ED= 0 [dm])
- Heading, pitch y roll medidos (EH, EP, ER)
- Salinidad manual (ES= 35 [psu])
- temperatura medida (ET)

**TC2:** Configura muestreo a intervalos: 2 muestras por burst

**WP1:** 1 pin por ensemble

**TB00:00:01.20:** Duración del intervalo

**TE00000100:** 1 ensemble por segundo

**TP000100:** Un segundo entre pings

**WN020,WS0800,WF0176:** número de bins, espesor y blanqueo [cm]  
**LW1:** modo *narrow bandwidth* para extender el rango un 10%  
**WV250:** velocidad de ambigüedad [cm]  
**LZ30,220:** umbrales de amplitud y correlación para la detección del fondo  
**SM1:** configurar como *master*  
**SM2:** configurar como *slave*  
**SA001:** transmitir un pulso de sincronización antes de cada ping  
**SW05500:** espera 55 segundos después de emitir el pulso de sincronización  
**SI0:** # de ensembles a esperar antes de enviar el pulso de sincronización (este se envía cada ping)  
**RNM0908:** renombrar los ficheros. Solo admite 5 caracteres.

Esta configuración se basa en los resultados adquiridos en la experiencia. Un problema general es que los ecos recibidos por los WH de 300 kHz sufren bastante en estaciones profundas a partir de los 1500 m. Este problema parece estar relacionado con la física de los flotadores pasivos, especialmente en aguas profundas limpias. Por ello en campaña conviene modificar los parámetros de adquisición en función de los perfiles a realizar, típicamente:

Estaciones profundas: **TB00:00:01.20;WN018,WS1600,LW1.**

Estaciones someras: **TB00:00:00.80;WN010,WS0400,LW0.**

## Protocolo de funcionamiento y la descarga de datos de LADCP

El presente protocolo está basado en el informe de campaña JR67 (Bacon, 2002) y su adaptación al equipo LADCP del IEO. Se recomienda usar este protocolo en conjunción con un estadillo.

Al iniciar la campaña debemos sincronizar con el esquema GMT la fecha y hora de los equipos a utilizar en la adquisición de datos (ADCP, CTD y GPS). Esto requiere sincronizar primero el PC de la roseta y el/los CTD con la hora científica (típicamente GMT) del NMEA, y posteriormente el PC del LADCP con el de la roseta. Finalmente sincronizamos ADCP y PC con el comando <^T> en la consola del **BBTalk**.

## MASTER/SLAVE: comunicación y puesta en funcionamiento

1. Picar **BBTalk** en la consola del PC y abrir una ventana para cada instrumento (Figura 11). Comprobar que la velocidad de conexión sea de 9600 baudios (CB411). En la 3a ventana marcamos las casillas **Send\_Break\_on\_**

`new_connection` y `Send_CK_on_Baud_Rate_Change`. Ha de aparecer un mensaje conforme se ha enviado un break y luego el símbolo de introducir comandos

```
[BREAK Wakeup A]
WorkHorse Broadband ADCP Version 16.30
RD Instruments (c) 1996-2008
All Rights Reserved
>
```

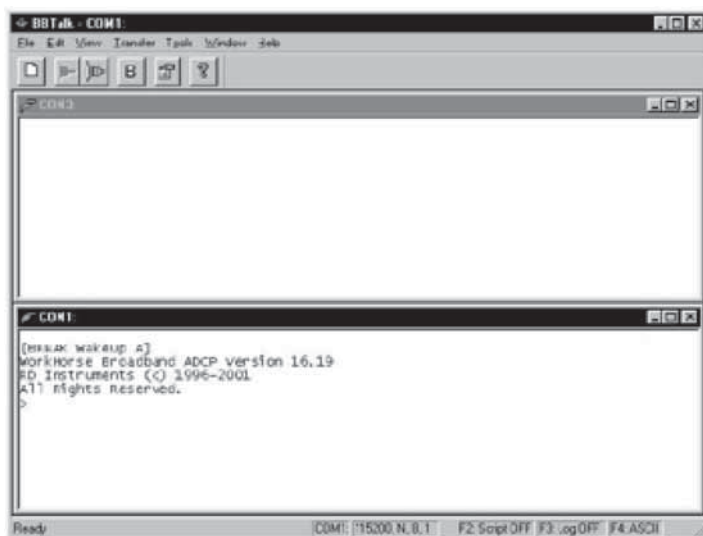


Figura 11. Consola de BBTalk con dos puertos abiertos.

Si no se despierta, mandar un *break* para despertar al ADCP pulsando el icono **B** de la barra de herramientas o con la tecla <Fin> o <End>. Si falla la conexión, chequear el cable de comunicaciones o los parámetros de conexión (*baud rate*, puerto COM, paridad...). Si sigue sin conectar o aparecen símbolos extraños, hay que ir a la ventana a la derecha del **B** (que tiene una hoja y un dedo) y pinchar **auto\_detect\_ADCP**. Algunas veces puede haber algún problema con el *firmware*, de forma que los parámetros de conexión (definibles por el usuario) y el reloj se vuelven a unos *defaults*. Para restablecer la velocidad debemos modificar manualmente con el comando CB (ver ayuda tecleando **CB?** en la consola de BBTalk o en el manual *WH commands and output data format*). Si sigue sin conectar, cerrar todos los BBTalk y comprobar que los conectores están bien conectados a los puertos serie del ordenador. Si sigue sin comunicar desconectar todo y esperar 5 minutos (es el protocolo de comunicación). Si aun así no

comunica, verificar baterías. Si el problema no es de las baterías no debemos limpiar los conectores ni cables con CRC u otro producto abrasivo. El CRC y otros lubricantes y desecantes contienen derivados del petróleo que desgastan el caucho de los conectores. Aunque logremos restablecer la conexión, los conectores se van desgastando y el problema no hará más que empeorar. Lo más práctico es sustituir el cableado y secar bien los elementos metálicos de los sustituidos. Se recomienda aplicar grasa de silicona (DC111 o similar) u otro lubricante hidrófobo tan solo en la parte de goma de los conectores.

*NOTA: SI ALGUNO DE LOS INSTRUMENTOS NO HA RECIBIDO ÓRDENES EN MÁS DE 5 MINUTOS SE DESCONECTA AUTOMÁTICAMENTE; EN ESTE CASO TENEMOS QUE VOLVER A EMPEZAR TODO EL PROCESO*

2. (Opcional) Ejecutar <F3> para crear un archivo de registro (log) donde se almacenen todas las órdenes y demás incidencias de este instrumento. Podemos dar un nombre del tipo cast####up.txt o cast####dn.txt. La raíz cast### (donde ### es el número de cast) es útil si el almacenamiento se hace por orden de cast. Las terminaciones \*dn.txt y \*up.txt hacen referencia al MASTER/SLAVE5.

3. El reloj de los ADCP suele derivar bastante, por tanto conviene verificar la sincronización de equipos con el reloj del PC, que debe estar sincronizado con la hora GMT al igual que el CTD/roseta y su PC. Para efectuar este control teclear TS?<ENTER> en la consola del BBTalk. Si existe desfase debemos resetear el reloj de cada uno de los LADCP tecleando TSyyyMMdddhmmss<ENTER>, o bien con el comando <^T>.

*Sincronización de Relojes → Muy importante en el inicio de la campaña*

A. Primer uso de los ADCP en la campaña → Tras establecer la comunicación y si es la primera vez que usamos el ADCP en la campaña, se tiene que sincronizar el **RELOJ INTERNO** del ADCP con el del ordenador. Para ello debemos comprobar que el ordenador tiene la hora correcta y dentro del BBTalk con la ventana del ADCP correspondiente ACTIVA (SLAVE primero), hacemos un

**CTRL + T**

B. En las siguientes estaciones tras la sincronización inicial → Es recomendable ir comprobando que la hora del ADCP corresponde con la del ordenador. Escribiendo en el intérprete de comandos el comando "TS?", nos devuelve la hora de los ADCP. Si esta hora no coincide con la del ordenador, hay que repetir el paso A.

4. Comprobar la memoria disponible mediante **RS?<ENTER>**. Actualmente ambos instrumentos van equipados con memoria más que de sobra para almacenar una campaña completa. En caso de duda, y para evitar posibles conflictos debemos limpiar con cierta frecuencia la memoria aplicando **RE ErAsE<ENTER>** (case sensitive). Esto debemos hacerlo solo una vez los datos hayan sido transferidos, verificados y salvaguardados.

5. (opcional). Realizar los controles de diagnóstico **PA<ENTER>**. Esto lleva un tiempo. Nota: el **Receive Path (PT3)** y el **Bandwidth (PT6)** pueden fallar para los tests realizados en seco. Los demás controles deberían pasar.

6. Verificar que ambos instrumentos están ajustados a 9600 bd. Si hay comunicación a través del terminal la velocidad de la misma debería aparecer en la parte inferior de la ventana sobre la barra de estado. En caso de duda teclear CB411. Este comando modifica la velocidad tanto en el instrumento como en el terminal. ESTE PASO ES CRÍTICO PARA ASEGURAR LA SINCRONIZACIÓN ENTRE INSTRUMENTOS. CUALQUIER OTRA CONFIGURACIÓN NO ASEGURA LA COMUNICACIÓN ENTRE DOWN- Y UPLO-OKER Y RESULTARÁ EN INTERFERENCIAS INCONTROLADAS.

7. Presionar **<F2>** para cargar el fichero de comandos, empezando por el SLAVE. El informe detallado de los contenidos de estos archivos se puede encontrar al final del presente documento. Esperar a que salga el mensaje de desconexión para proseguir. A partir de este momento los LADCP deberían comenzar a emitir (será posible escuchar el ping a intervalos), acercándonos a los transductores (los 4 círculos de color naranja) y escuchando el sonido, o bien con la ayuda de un *walkie*. Tras comprobar que ambos emiten, ya podemos iniciar el perfil.

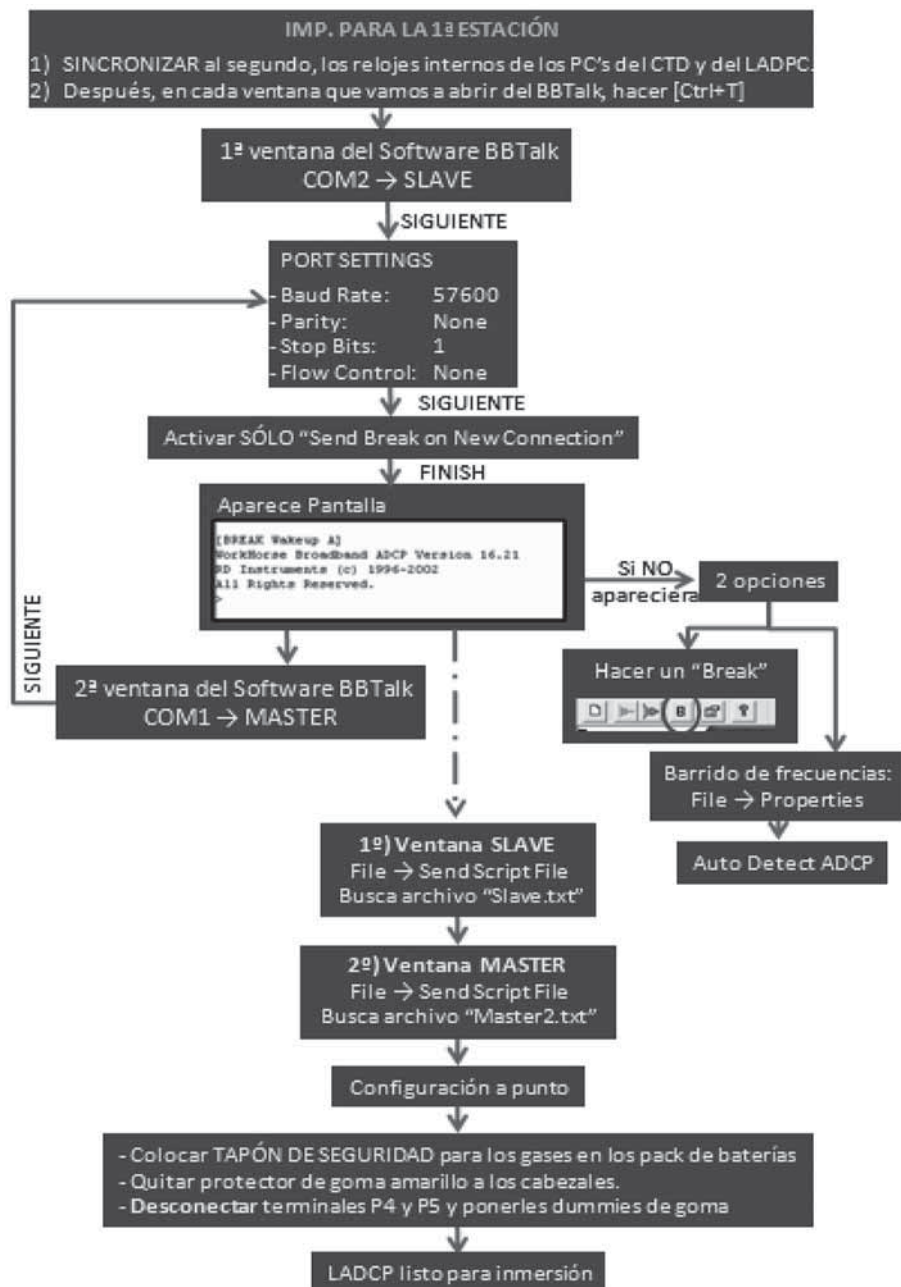
8. Desconectar los terminales de las fuentes de alimentación de los instrumentos. Bajo ningún concepto manipular los cables y conectores de los ADCP ligados a la fuente de alimentación. Secar externamente y desconectar los terminales de los cables de comunicación y poner los conectores ciegos o *dummies*.

9. Quitar las tapas amarillas. Estas deben estar colocadas de día SIEMPRE, para evitar la luz del sol sobre la superficie de uretano que recubre la cerámica de los transductores.

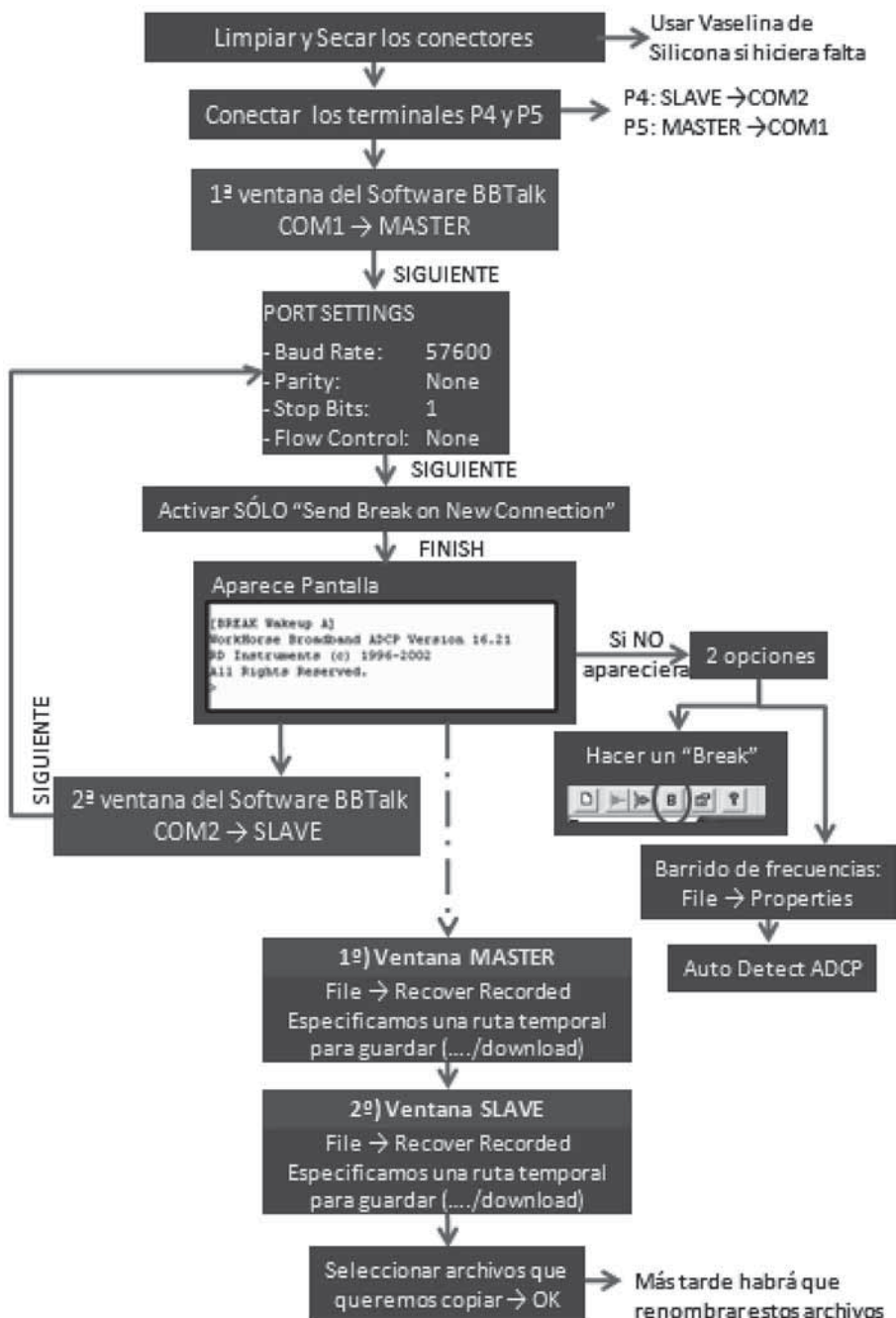
10. Comunicar por *walkie* o teléfono con el puente que ya se puede bajar la roseta. Deberíamos verificar que las acciones se registran en papel. Esto, además de facilitar la posterior organización y renombramiento de los archivos, permite asegurar el correcto desarrollo de todos los pasos y que no omitimos ninguno.

## Cuadro sinóptico de la técnica

## Puesta en el agua del LADCP



## Descarga de datos del LADCP





## Cálculo de los resultados

### Detención de la adquisición y descarga de datos del sistema LADCP

1. Al acabar el perfil, se endulzan los conectores. Se secan bien los cables con un papel que no deje pelusas antes de quitar los *dummies* de los conectores P4 y P5. Si hubiese entrado agua se vuelve a secar con cuidado antes de conectar los cables de datos a las terminaciones en la roseta. Conviene haber marcado cada terminal con brida o una cinta de color para distinguir el *downlooker* (MASTER) del *uplooker*.

2. Aclarar con agua dulce los instrumentos y colocar las tapas de plástico a cada ADCP, para proteger a los transductores del sol y de posibles arañazos.

3. Conectar los terminales de la fuente de alimentación al cable I/O. Ejecutar **BBTalk** según se indica en el punto 1 del epígrafe anterior. Se recomienda descargar primero los datos del MASTER, ya que como el SLAVE es guiado por el MASTER, este parará de tomar datos al iniciar la conexión con el MASTER.

4. Verificar el número y fecha de cierre de fichero de las estaciones con **rr<ENTER>**. Algunas estaciones debido a la larga duración o el excesivo tamaño pueden aparecer como más de un archivo. En este caso debemos volcar todos los ficheros generados. Por ejemplo, puede aparecer una pantalla de este modo:

```
MLADC000.000
MLADC000.001
MLADC002.000
MLADC003.000
MLADC003.001
```

En este caso hay 3 casts: los 1 y 3 tienen dos archivos distintos, mientras el 2 solo tiene uno.

5. Volcado. En cada una de las ventanas del **BBTalk** configurar los instrumentos para la máxima velocidad de transmisión (115200 bd, **CB811**). Posteriormente, en la barra de herramientas ir a **File—>Recover\_Recorder**. A veces hay que repetir este proceso hasta que realmente comienza a bajar los ficheros. Seleccionamos la carpeta dónde queremos archivar. Después de confirmar una pantalla nos muestra los archivos que tiene en memoria el ADCP. Seleccionamos el archivo para volcar (normalmente será el último el que queremos descargar).

Nos aparecerá la pantalla de la Figura 12, indicándonos que la descarga del fichero se está realizando. No hay que darle importancia a los caracteres ilegibles que aparecen en el intérprete de comandos.

La duración de la descarga de datos varía dependiendo del tiempo en el que han estado recogiendo datos, teniendo relación directa con la profundidad de la estación realizada. Un perfil de 4000 metros puede tardar en descargarse unos 20 minutos.

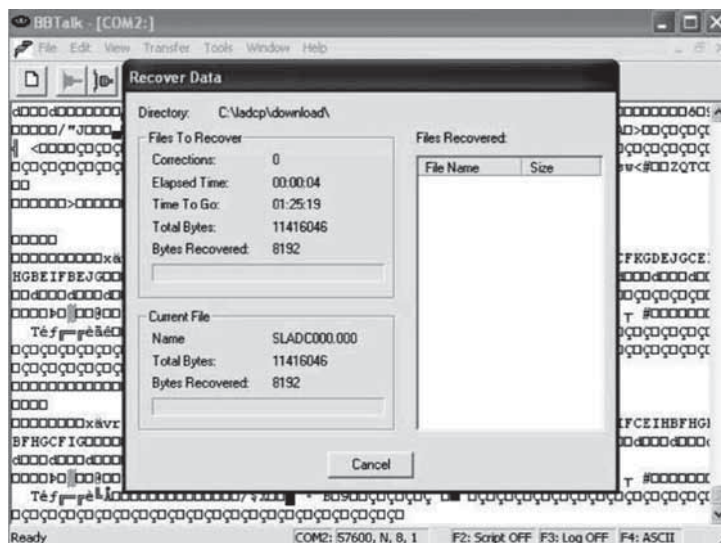


Figura 12. Pantalla de descarga de datos.

Posteriormente realizamos la misma operación para los datos del SLAVE.

6. Comprobación de volcado correcto: en la ventana de **BBTalk** tecleamos el comando **rr<ENTER>**. Con él comprobamos lo que hay en memoria y el tamaño de los archivos, para asegurarnos si hemos descargado totalmente el fichero correspondiente ver el estado de la memoria (espacio ocupado/libre). Verificar con **WinADCP** que el número de ensembles y la calidad de los datos son razonables. Esto no es esencial, ya que los errores de fondo se detectan realmente durante el procesamiento posterior, pero puede ayudar a detectar errores en la adquisición o en la comunicación. Hemos detectado a veces problemas en alguno de los haces al comprobar la intensidad del eco de cada uno (en **Options/Chart Options/Contour**).

8. Una vez finalizado el volcado restituimos la velocidad de comunicación a 9600 bd con **cb411**, para posteriormente apagar los instrumentos con **cz<ENTER>**. Luego hacemos una copia del archivo en otro directorio (y a ser posible hacemos un *back-up* en otra unidad física) renombrando, ese mismo fichero, de acuerdo con la nomenclatura que se adopte en la campaña. Típicamente los renombramos en función del cast: para el downloader es **###dn000.000** mientras que el *uplooker* es **###up000.000** ('dn': downward-looking; 'up': upward-looking). Así tendremos ya dos copias de cada perfil.

Anotar en el estadillo, hora y nombre del archivo. Al finalizar la descarga, quitar los cables del cabezal y poner los *dummies*. Cuando se hayan descargado los dos ADCP, se creará una carpeta con la nomenclatura **XXX**, donde X será el número de la estación en la que se recogieron esos datos.

Dentro colocaremos los ficheros del MASTER y del SLAVE (se recomienda hacer copia de seguridad de los datos en otra carpeta del propio ordenador así como en otro medio extraíble).

## Procesado de datos LADCP

Para obtener la velocidad absoluta de la corriente, el movimiento de la roseta durante el perfil (desconocido, pero estimable) debe ser eliminado durante el post-procesado. Existen varios métodos para esto, siendo los más comúnmente utilizados el de la Universidad de Hawái (Eric Firing) y del LDEO (Martin Visbeck). El método de Firing aísla el movimiento de la roseta al superponer, y promediar los perfiles de las cizallas verticales para construir un super-perfil. Este es integrado verticalmente para obtener la velocidad baroclina, siendo la constante de integración la velocidad barotrópica (incógnita a priori), que se computa como la suma de la velocidad media y la deriva del barco, menos una corrección para tener en cuenta la velocidad de descenso. El método de Visbeck soluciona un problema inverso para aislar el movimiento de la roseta usando una técnica de mínimos cuadrados. Este método permite aplicar condiciones de contorno, como pueden ser las velocidades referenciadas en el fondo (*bottom-tracked*), y datos de navegación y de doppler de casco, para mejorar los perfiles. Este método permite, además, incluir más de un instrumento durante el procesado. Ambos métodos difieren en los algoritmos de cálculo pero, si los datos son buenos, deben proporcionar resultados razonablemente similares.

Los detalles exceden los propósitos del presente manual. No obstante, además de los ficheros binarios del instrumento, es necesario recopilar cierta información durante la realización de un perfil de LADCP para el procesado de los datos:

**Perfil hidrográfico:** para aplicar las correcciones a la velocidad del sonido es necesario tener perfiles de temperatura y salinidad con una resolución temporal de al menos (o mejor que) la frecuencia de muestreo del LADCP, que suele ser del orden de 1 Hz. Esto significa que tenemos que promediar un perfil de CTD en intervalos regulares de 1 s. La serie temporal resultante se ajusta al perfil de LADCP sobre una base temporal o bien sobre las estimaciones de velocidad vertical. Es aconsejable minimizar (o evitar) los huecos importantes en los datos, dada la dificultad de tratar con ellos para el post-proceso de los mismos.

**Datos de navegación:** son esenciales para determinar la deriva del barco y la posición absoluta de la roseta durante el perfil. La deriva del barco añade una condición de contorno para la estima de las velocidades, por lo cual es esencial saber las posiciones inicial y final de la estación. Estas pueden variar en función de los parámetros del procesado, por lo que es aconsejable almacenar constantemente la posición. Una forma de hacerlo es me-

diente la captura directa de datos de NMEA. Para ello necesitamos un cable conectado a una de las mangueras y un PC que reciba y capture los datos a través de un terminal (por ejemplo, hyperterm). Al contrario del ajuste CTD/LADCP, no existen puntos de referencia para ajustar temporalmente la navegación al perfil, por lo que se necesitaría (acciones no excluyentes):

Evitar los desfases horarios: Sincronizar todos los instrumentos a un marco común, típicamente hora GMT. Almacenar la navegación en el perfil de CTD. No todas las unidades de cubierta pueden hacerlo; en caso de problemas con el cable electromecánico pueden surgir dificultades. De forma general es recomendable grabar un fichero de navegación y asegurar la sincronización de todos los equipos de forma sistemática.

**Datos de ADCP de casco (VMADCP):** estos son de mucha utilidad para constreñir la solución cerca de la superficie. Los programas de procesamiento que usamos actualmente utilizan promedios sobre intervalos de 3-5 minutos, por lo que no es necesaria una altísima resolución temporal. Los desfases temporales, si no son muy acentuados, tampoco son causa de graves problemas. Tampoco es esencial suministrar datos altamente elaborados; un mínimo grado de procesamiento suele bastar para el tratamiento del LADCP.

**Rastreo de fondo (BT):** la interferencia del eco del LADCP con el fondo permite obtener velocidades referenciadas, no ya al instrumento, sino sobre un marco de referencia fijo (el fondo). Si el instrumento dispone de BT, estas velocidades se calculan internamente por el mismo gracias a *pings* dedicados que emplea a tal efecto. En caso contrario es posible calcularlas a partir de algoritmos durante el post-procesado, siempre que el fondo esté al alcance (acústico) del instrumento.

## Control de calidad: inspección visual con WinADCP

Una vez acabado el perfil se puede controlar el funcionamiento de los equipos con la ayuda de **WinADCP**. Hay varias cosas que pueden dar una idea del desempeño de los instrumentos.

**Detección del fondo en el *downlooker*:** abriendo el fichero podemos detectar si el BT ha funcionado correctamente. En los ejemplos de la figura 13 vemos en cuál de los ficheros el ping del BT detecta el fondo. Asimismo la intensidad de eco permite evaluar de un modo general la calidad de la señal.

Si en la inspección visual no observamos el fondo debemos cerciorarnos que está configurado con el comando `<ol>` en **BBTalk**, y proceder a la actualización del *firmware* en caso negativo.

**Balances y giros en la roseta:** aunque la roseta tiene normalmente una aleta estabilizadora es conveniente indicar al puente que intente que el cable baje vertical. Esto no siempre va a ser posible, por lo cual generalmente notamos balances y rotaciones. Torsiones exageradas debido a rota-

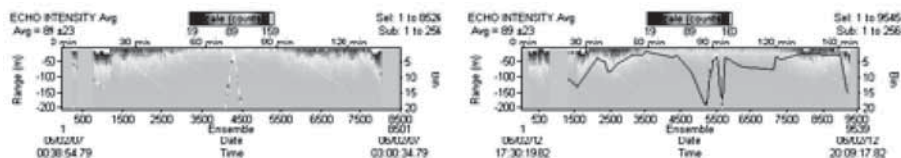


Figura 13. Intensidad promedio de eco en dos perfiles. En ambos perfiles se ha especificado como opción de mapeado 'BT Depth' en 'Contour/appearance', y 'Processing/ End of Profile', dentro de 'Charting options'. En el panel de la izquierda el instrumento no interpreta correctamente la detección del fondo.

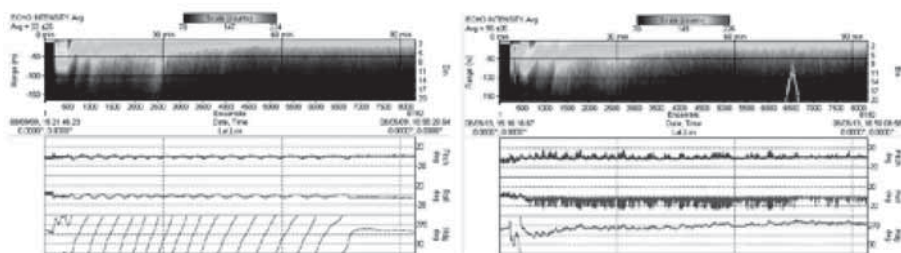


Figura 14. Desempeño de la roseta. En el panel de la izquierda notamos 17 giros en 80 minutos durante el descenso. En el panel de la derecha notamos vibraciones en una roseta poco lastrada. Los datos provienen de la campaña RadProf0908 (septiembre de 2008).

ciones no recuperadas, así como continuos tirones afectan tanto a la calidad de los datos como a la seguridad a bordo y la vida del cable. Es posible evaluar el funcionamiento, tirones y giros de la roseta, como muestra la Figura 14. Podemos ver que la roseta va aproximadamente bien equilibrada (los ángulos de cabeceo y balance son cercanos a 0) pero probablemente debido a la fuerte corriente y a los balances del barco esta realiza un número excesivo de giros que no consigue recuperar en la subida. En el panel de la derecha de la Figura 13 notamos pequeñas oscilaciones (roseta nerviosa debido a una falta de lastre) de forma que cualquier balance del barco se propaga rápidamente a los instrumentos.

**Interferencias con otros instrumentos acústicos:** un asunto que nos ha venido intrigando desde el inicio de las campañas es la fuente de interferencias notadas en los perfiles de LADCP. El pinger (altímetro) es el principal generador de estos ecos no deseados (Figura 15). En otras ocasiones es la interferencia entre up- y downlooker mal sincronizados la causante del ruido. Hay que recordar que para que la sincronización entre MASTER/SLAVE sea adecuada ambos instrumentos deben entenderse a una velocidad máxima de 9600 bd.

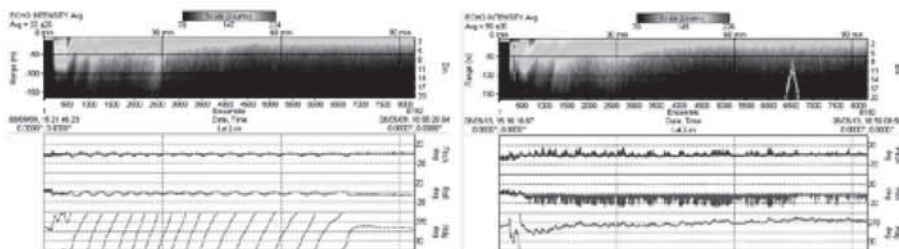


Figura 15. Interferencia del *downlooker* con el ping del altímetro. Esta es notable en el panel de la izquierda. Como se ve en el panel de la derecha, la interferencia desaparece al desconectar el altímetro.

## Referencias

- Bacon, S. 2002. «RRS *James Clark Ross* Cruise 67, 19 Nov-17 Dec 2001. Drake Passage repeat hydrography: Woce Southern Repeat Section 1b-Burdwood Bank to Elephant Island». Southampton Oceanography Centre, *Cruise report* N° 38, 118 pp.
- FISCHER, J., M. VISBECK. 1993. «Deep velocity profiling with self-contained ADCPs». *J. Atm. Oc. Tech.* 10, 764-773.
- POSTEL, L., A. J. DA SILVA, V. MOHRHOLZ, H-U. LASS. 2007. «Zooplankton biomass variability off Angola and Namibia investigated by a lowered ADCP and net sampling». *J. Mar Sys.* 68: 143-166.
- SÁNCHEZ LEAL, R. F., M. RUIZ-VILLARREAL, M. A. ZORITA, Equipo VACLAN. 2009. *Sistema LADCP WH300 Dual para el IEO. Manual de montaje, utilización y mantenimiento*. Documento Interno VACLAN (REN2003-08193-C03-01/MAR) / COVACLAN (CTM2007-64600/MAR). IEO. 7 de septiembre de 2009.
- THURNHERR, A. M., M. VISBECK, E. FIRING, B. A. KING, J. M. HUMMON, G. KRAHMANN, B. HUBER. 2010. «A Manual for Acquiring Lowered Doppler Current Profiler Data». En: *GO-SHIP Repeat Hydrography Manual: A Collection of Expert Reports and Guidelines*. IOCCP Report No. 14 ICPO Publication Series No. 134. V.1, 2010. [http://www.go-ship.org/Manual/Thurnherr\\_LADCP.pdf](http://www.go-ship.org/Manual/Thurnherr_LADCP.pdf)
- THURNHERR, A. M. *LADCP data acquisition and processing site* <http://www.ldeo.columbia.edu/~ant/LADCP/>
- TRDI. 2007. Lowered ADCP User's guide. P/N 957-6195-00 (January 2007) University of Hawaii LADCP documentation. [http://currents.soest.hawaii.edu/docs/ladcp\\_doc/index.html](http://currents.soest.hawaii.edu/docs/ladcp_doc/index.html)
- VISBECK, M. 2002. «Deep velocity profiling using Lowered Acoustic Doppler Current Profilers: Bottom track and inverse solutions». *J. Atm. Oc. Tech.* 19: 794-807.

## **Análisis de muestras de salinidad. Salinómetro de laboratorio Autosal 8400B**

<sup>1</sup>Pérez Hernández, M.D.; <sup>2</sup>Nuez de la Fuente, M.; <sup>2</sup>Vélez Belchí, P.; <sup>2</sup>Benítez Barrios, V. M.; <sup>2</sup>López Laatzen, F.; <sup>2</sup>Fraile Nuez, E.

<sup>1</sup>*Universidad de Las Palmas de Gran Canaria*

<sup>2</sup>*C.O. Canarias, Instituto Español de Oceanografía*

### **Finalidad. Campo de aplicación**

El salinómetro Autosal 8400B es un aparato de gran utilidad para la determinación de la salinidad (conductividad) del agua de mar, haciéndolo con un elevado grado de exactitud. Las medidas siempre se hacen en comparación con un patrón de salinidad conocido. Este equipo se utiliza para calibrar la salinidad medida tanto por el termosalinógrafo instalado a bordo como por los CTD.

### **Equipamiento necesario**

Salinómetro de Laboratorio Guildline Modelo 8400B “Autosal”.

### **Reactivos u otro material fungible**

Para el uso del equipo Autosal se necesita:

- agua destilada para ir limpiando entre muestras
- agua *ultrapura* para el llenado del baño térmico
- agua estándar, es decir muestras de salinidad de referencia certificada.

### **Calibración**

Este procedimiento hay que realizarlo cada vez que se comienza una tanda de medidas o se interrumpe el análisis.



## Estandarización

1. Se agita una botella de salinidad estándar.
2. Se limpia el circuito con agua destilada. Para ello introducimos el capilar en la botella. Con el selector FUNCTION en ZERO, accionamos PUMPS ON y giramos la palanca de la bomba peristáltica una posición a la derecha. Con el botón FLUSH presionamos y soltamos varias veces para limpiar bien el circuito. No girar la palanca de la bomba peristáltica a su posición dos, que si es verdad que succiona más rápido, se pueden colar burbujas en el circuito. Llenamos y vaciamos varias veces.
3. Controlar que no quedan burbujas en el circuito. En su caso, jugar con la bomba (succionamos agua y aire) y el botón FLUSH hasta que la burbuja desaparezca.
4. Se coloca la botella de agua estándar en el soporte, introduciendo el tubo de succión dentro de la botella y cuidando que la botella quede bien sujeta.
5. PUMPS ON.
6. Se enciende la bomba peristáltica girando la palanca un punto hacia la derecha.
7. Cuando esté llena la célula, se vacía tapando la válvula FLUSH con el dedo. Se repite otras dos veces.
8. Se gira la palanca de la bomba peristáltica a la izquierda para desconectarla y seleccionamos PUMPS OFF.
9. Se coloca el selector FUNCTION en la posición READ.
10. Con el selector SUPPRESSION se ajusta la lectura hasta que dejen de parpadear los números del display.
11. Con el botón STANDARDIZE, se quita la pestaña de seguridad y se mueve poco a poco hasta que el valor del display sea dos veces la K15 de la botella de agua estándar. Se vuelve a colocar la pestaña de seguridad.
12. Se anota el STD (Rs) en el estadillo, que es el valor que hemos puesto en el paso anterior.
13. Se coloca el selector FUNCTION en ZERO.
14. PUMPS ON → FLUSH → BOMBA PERISTÁLTICA ON → llenado de la célula cuidando de que no queden burbujas en el circuito.
15. BOMBA PERISTÁLTICA OFF → PUMPS OFF.
16. Colocamos el selector FUNCTION en READ. Anotamos en el estadillo el valor del ratio de conductividad mostrado en el display.
17. Repetimos los pasos 13 a 16 hasta que nos den tres valores idénticos en el display. Nos tenemos que fijar que en el display siempre se muestre [valor + valor], en el caso de que parpadee o de un signo menos [valor – valor], jugaremos con el selector SUPPRESSION para obtener el resultado [valor + valor].



## Cero inicial

1. Situar el selector FUNCTION en la posición ZERO.
2. El display debe mostrar en los últimos 4 dígitos el valor 0000 o aproximado. Si no es así, mirar manual. Se anota en el estadillo de análisis. También se anota el Sby inicial, girando el selector FUNCTION a la posición de STANDBY.

## Descripción de la técnica

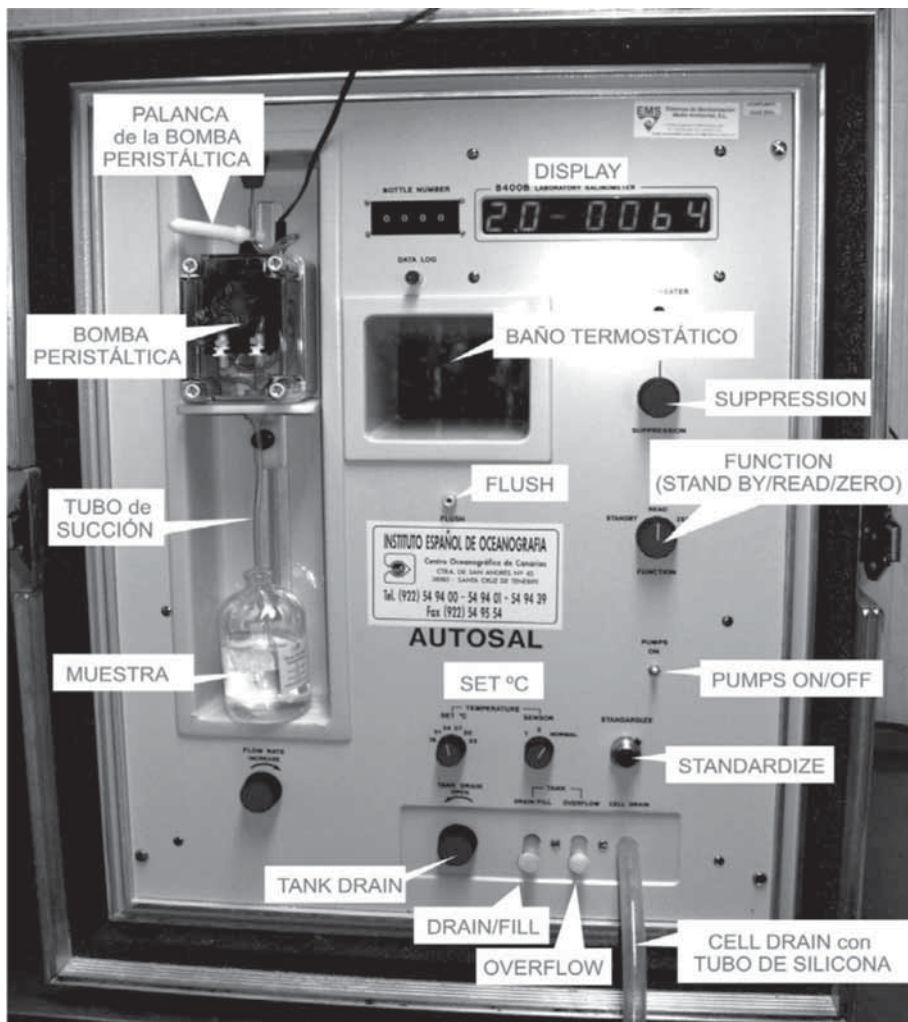


Figura 1. Esquema del Autosal.

## Procedimiento inicial

1. Llenar el salinómetro con agua destilada (NUNCA CON AGUA DE MAR). Para ello colocamos un tubo de silicona donde pone DRAIN/ FILL y otro donde pone OVERFLOW y abrimos donde pone TANK DRAIN al máximo. Echamos agua hasta que rebose por OVERFLOW y entonces cerramos la llave del TANK DRAIN.
2. Enchufar el baño termostático y el transformador a la corriente. El transformador irá conectado a la bomba peristáltica.
3. Encender el Autosal 24 horas antes del análisis de las muestras, para que el baño se caliente hasta la temperatura ambiental, mediante el botón de encendido de su parte trasera.
4. Se debe ajustar el selector SET °C al valor mas cercano de la temperatura del laboratorio. La temperatura del salinómetro siempre debe ser inferior a la temperatura ambiente. El baño estará caliente cuando las lámparas del baño se enciendan y se apaguen en intervalos constantes.
5. Quitamos los dos tubos y situamos uno de ellos en CELL DRAIN. El drenaje debe ir, mediante un tubo de silicona, a parar a un recipiente en el que el tubo de drenaje no llegue a tocar con la superficie de agua drenada.
6. En el momento de comenzar a utilizar el aparato, es necesario apuntar en el estadillo correspondiente: Campaña, barco, remesa agua STD, Tª inicial del laboratorio, Guideline (modelo y nº referencia del salinómetro), cero inicial, SBY inicial (el selector FUNCTION lo giramos a la posición de STANDBY y su valor será la temperatura más un número), nombre del observador, fecha, 2xK15 (K15 viene anotado en la botella de agua de mar estándar OSI), STD(Rs) (es el valor que ponemos en el botón STANDARIZE para que la lectura sea dos veces el K15 de la botella de agua estándar).

## Análisis de muestras

Es mejor medir muestras de salinidad parecida, para así evitar los cambios bruscos de salinidad de una muestra a otra. Además, es deseable seguir un orden alternativo en la profundidad de las muestras, de modo que la salinidad de cada muestra sea similar, en lo posible, a la muestra anterior y posterior.

1. Se agita bien la botella de muestra.
2. Anotamos: orden, muestra, profundidad, razón de conductividad y cualquier otra observación.

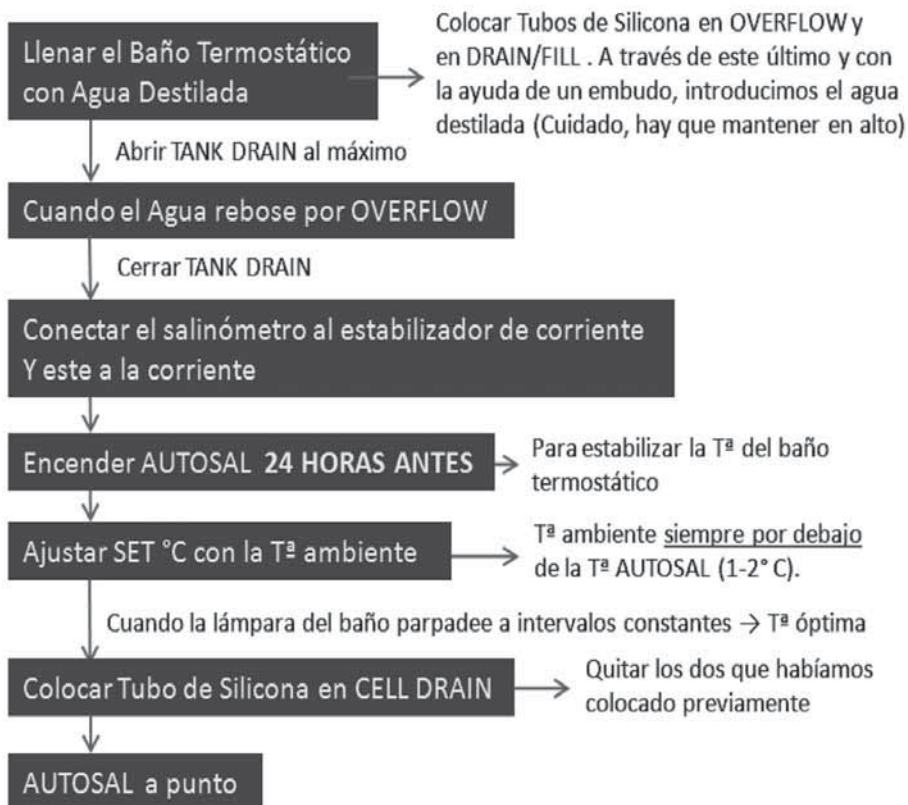
3. Se destapa con mucho cuidado de que no entren restos de sal del tapón dentro de la botella y se coloca en el soporte, fijándolo bien.
4. El selector FUNCTION debe estar en la posición ZERO.
5. Se enjuaga la célula de conductividad 3 veces con la muestra, vaciándola tapando la válvula FLUSH con el dedo cuando esté completamente llena.
6. Se deja la muestra entre 1– 2 minutos para que se estabilice.
7. Se lava de nuevo el circuito 3 veces.
8. Se coloca el selector FUNCTION en la posición READ.
9. Con el selector SUPPRESSION se ajusta la lectura hasta que dejen de parpadear los números del display o para cambiar el signo a positivo (prestar especial atención).
10. Se anota la lectura del ratio de conductividad mostrado en el display.
11. Se repiten los pasos 5 a 9 una o dos veces, según los resultados obtenidos, hasta que nos de una medida muy similar.

### Procedimiento final

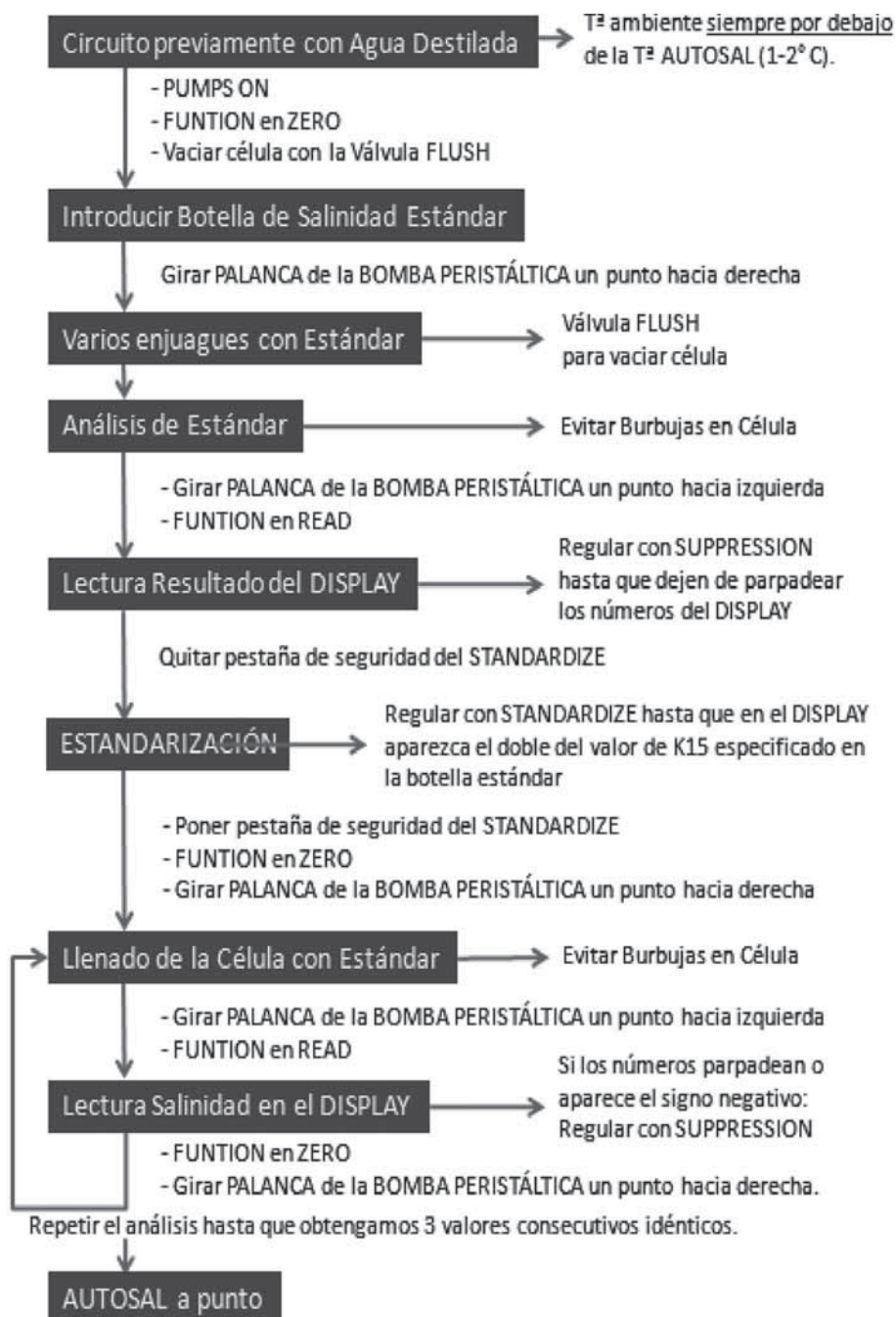
1. Al finalizar el análisis de las muestras se debe anotar en el mismo estadillo: Cero final,  $T^a$  final laboratorio y valor del STANDBY final.
2. Se seca bien el tubo de succión, dejando una burbuja de aire en él antes de continuar con el siguiente paso.
3. Se coloca una botella de agua destilada y se enjuaga 3 veces con ella.
4. Se deja la célula de conductividad llena de agua destilada, junto con la botella acoplada al tubo.
5. Se apaga la bomba de succión mediante el botón “PUMP”.
6. Se apaga el salinómetro con el botón en la parte trasera del mismo.

## Cuadro sinóptico de la técnica

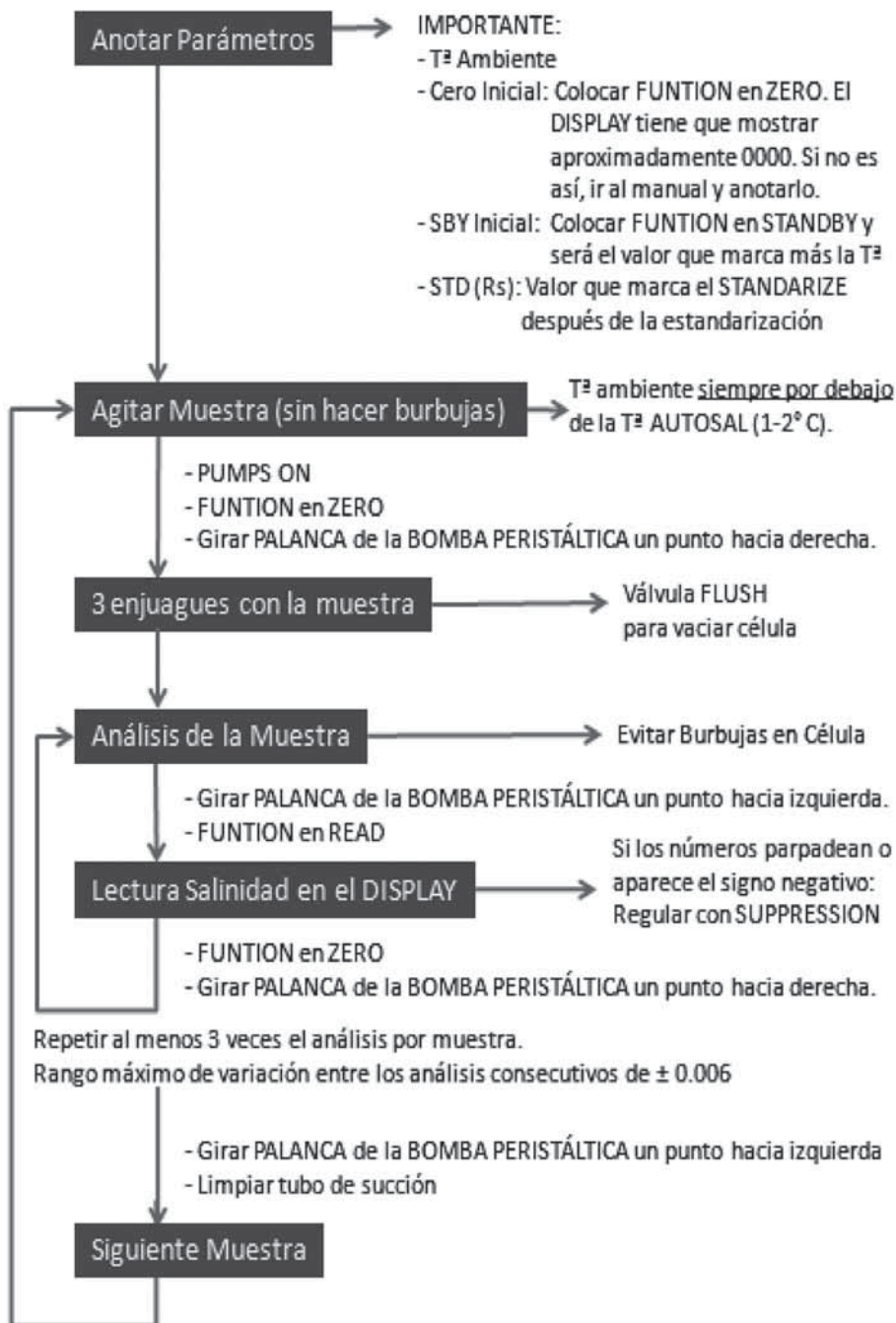
### Puesta en marcha del AUTOSAL (24 h antes)



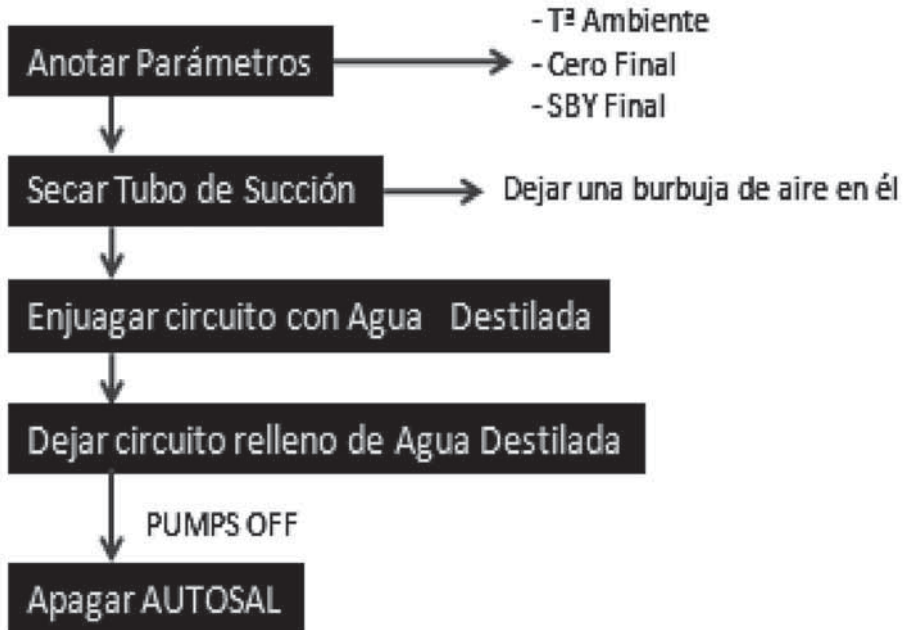
## Estandarización del Autosal



## Análisis de salinidad en muestras de agua



### Apagado del Autosol



### Cálculo de los resultados

A partir de los ratios de conductividad obtenidos durante la medida de cada muestra, se calcula el valor de la salinidad usando las siguientes expresiones (Lewis, 1980):

$$R_i = \frac{RC + \frac{(STD_i - STD_f) \cdot n.o.}{(N+1)} + (2K_{15} - STD_i)}{2}$$

$$S = 0.008 - 0.1692 \cdot R_i^{0.5} + 25.3851 \cdot R_i + 14.0941 R_i^{1.5} - 7.0261 \cdot R_i^2 + 2.7081 \cdot R_i^{2.5}$$

$$+ \frac{T_{\text{sc}} - 15}{1 + 0.0162 \cdot (T_{\text{sc}} - 15)} \cdot (0.0005 - 0.0056 \cdot R_i^{0.5} - 0.0066 R_i - 0.0375 \cdot R_i^{1.5} + 0.0636 \cdot R_i^2 - 0.0144 \cdot R_i^{2.5})$$

donde  $RC$  es el ratio de conductividad,  $STD$  el ratio de conductividad durante las estandarizaciones inicial y final, denotadas con subíndices  $i$  y  $f$ , n.o. el número de orden de la muestra analizada,  $N$  el número total de muestras analizadas,  $K_{15}$  el ratio de conductividad del agua estándar y  $T$  la temperatura ambiente en grados centígrados.



## Control de calidad

El análisis se realiza por triplicado en cada muestra. Si la desviación estándar del ratio de conductividad es mayor de 0.00005, se repiten los análisis.

## Referencias

LEWIS, E. L. 1980. «The Practical Salinity Scale 1978 and Its Antecedents». *IEEE J. Oceanic Eng.* OE-5, 1, 3-8.



# 2

## BIOGEOQUÍMICA DEL OCÉANO: CARBONO, NUTRIENTES Y GASES TRAZA

---



# Muestreo y análisis de oxígeno disuelto (O<sub>2</sub>) en agua de mar

<sup>1</sup>Álvarez, M.; <sup>2,3</sup>Pelejero, C.; <sup>3</sup>Calvo, E.; <sup>3</sup>Fernández-Vallejo, P.; <sup>3</sup>Movilla, J.;  
<sup>3</sup>López Sanz, A.; <sup>3</sup>Fernández-Guallart, E.; <sup>4</sup>Horstkotte, B.; <sup>1</sup>Company, B.

<sup>1</sup>C.O. A Coruña. Instituto Español de Oceanografía

<sup>2</sup>ICREA

<sup>3</sup>Institut de Ciències del Mar (CSIC)

<sup>4</sup>Instituto Mediterráneo de Estudios Avanzados (CSIC-UIB)

## Conceptos generales

El oxígeno disuelto en agua de mar se define como la cantidad de moles de oxígeno gas por kilogramo de agua de mar.

Método potenciométrico automático para la determinación de oxígeno disuelto en agua de mar basado en el método clásico Winkler. El método descrito es adecuado para niveles de oxígeno entre 0 y 400  $\mu\text{mol kg}^{-1}$  en agua de mar no contaminada, donde no halla sulfuro de hidrógeno.

El método aquí descrito es una adaptación del protocolo WOCE de Dickson (1995) donde se utilizan matraces especiales para oxígeno y con volumen calibrado, y en ellos se realiza el análisis. Se hará referencia a él porque se comparte el principio básico y gran parte del protocolo.

El principio químico de la metodología está en Dickson (1995).

## Finalidad. Campo de aplicación

Metodología para obtener y analizar muestras de oxígeno disuelto en agua de mar para concentraciones de 0-400  $\mu\text{mol kg}^{-1}$  pero donde no existe sulfuro de hidrógeno.

## Equipamiento necesario

### *Muestreo*

- matraces de muestreo: matraces winkler de cristal con sus correspondientes tapones de un volumen de 100 ml.

- dispensadores de los reactivos de fijación: dos dispensadores que dispensen alícuotas de 1 ml.
- tubo de tygon o de silicona para el muestreo: asegurarse que se puede fijar al pistón de la botella Niskin y que sea lo suficientemente largo para que entre hasta el fondo del matraz del muestreo y asegure la comodidad en el mismo.

### *Análisis*

- aparato de valoración potenciométrica (titrino, titrando u otro similar) con bureta de 5 ml y electrodo de platino para oxígeno, si se dispone de ellos vasos cerrados de valoración karl-fisher.
- dispensador de alícuotas de 1 ml para el ácido sulfúrico.
- pipetas de cristal de 1 y 10 ml para pipetear yoduro potásico.
- bureta knudsen de 50 ml.
- sistema de vacío (una bomba o una tropa de vacío) para aspirar la muestra fijada hacia la bureta knudsen.
- mangueras con grifo para el sistema de aspiración.
- termómetro para controlar la temperatura del laboratorio.
- soporte con pinza para sostener la bureta knudsen.
- agitadores magnéticos.

## Descripción de la técnica

### *Muestreo*

#### *Introducción*

Se debe muestrear la botella Niskin cerrada, es decir, el primero en abrir la botella debe ser el que muestree  $O_2$ , a menos que se muestree también CFCs que tienen prioridad. Esto es necesario para minimizar el intercambio aire-agua de  $O_2$  con el *head-space* en la botella.

#### *Procedimiento de muestreo*

- confirmar que la Niskin está cerrada (apretar el pitorro y no sale agua, ni gotea, si sale agua o gotea, anotar en el cuaderno de análisis).
- etiquetar adecuadamente los matraces de muestreo con la estación o *cast* y el número de la Niskin, utilizar cinta blanca de electricista que no se despegue y se escribe bien, los rotuladores indelebles se borran.
- colocar los matraces de muestreo y los reactivos de fijación en un lugar no peligroso donde no se rompan ni tropiece la gente con ellos.
- colocar la manguera de muestreo en el pitorro de la Niskin.

- colocar el otro extremo del tubo en el fondo del matraz de muestreo, abrir la Niskin y cebar el tubo, lavar el matraz con esa agua.
- llenar el matraz hasta rebosar dos veces su volumen, asegurarse de que no hay burbujas ni en el tubo ni en el matraz, colocar el tubo en el fondo del matraz y llenar.
- cerrar la Niskin.
- inmediatamente añadir el cloruro manganoso (1 ml) y la disolución de sosa (1 ml), la punta de los dispensadores se introduce como 1 cm dentro de los matraces de muestreo.
- cerrar el matraz con su tapón y agitar fuerte.
- comprobar que no hay burbujas dentro de la muestra fijada.
- seguir muestreando el resto de Niskin.
- reagitar todas la muestras una segunda vez, después de que se haya formado el precipitado.
- almacenar en zona fresca y oscura hasta que se valoren, cubrir con una bolsa de basura oscura, las muestras deben estabilizarse durante unas 24 horas.

### *Valoración potenciométrica*

#### *Montaje del sistema de valoración*

Hacer un esquema previo de todas las cosas a colocar en la encimera: titrino, soporte de bureta, sistema de vacío... Colocarlas de manera operativamente cómoda para el analista y los compañeros de laboratorio. En el laboratorio debería haber un fregadero cerca.

Cebat bien la bureta y los tubos del titrador con la solución de tiosulfato a usar, hacer varios lavados y ensayos con muestras de mentira antes de analizar las reales.

Colocar bien el electrodo y la bureta dosificadora en el vaso Kart-fisher, cuando se dosifique el tiosulfato debe ir hacia el electrodo.

Controlar la fuerza del sistema de vacío, la aspiración de la muestra debe ser suave, sin provocar burbujas, para eso se llevan grifos a colocar en la manguera que conecta la knudsen con la trompa de vacío.

#### *Secuencia de análisis*

Cualquier lote de muestras a analizar debe seguir este orden de análisis:

- arranque del sistema con muestras de mentira para eliminar burbujas de la línea de dosificación del tiosulfato.
- determinación del blanco.
- estandarización de la concentración del tiosulfato.
- valoración de las muestras.

### *Arranque del sistema*

Tomar un litro de agua de mar del continuo y dejar que se estabilice a la temperatura del laboratorio durante un día.

En el momento de empezar un lote de análisis, tomar 3 muestras de esta agua en los matraces de muestreo y fijarlas.

Valorarlas (ver más adelante), si se ven burbujas en la línea del tiosulfato, dar golpecitos a la misma para que se muevan.

### *Determinación del blanco*

Se denomina blanco a la cantidad de O<sub>2</sub> contenido en los reactivos y a la presencia de otros oxidantes o reductores en la muestra a parte del O<sub>2</sub>. El blanco de los reactivos se puede determinar experimentalmente pero aquí hemos usado los valores dados por Murray et ál. (1968) (ver DO<sub>reg</sub> en apartado siguiente).

El blanco debido a la presencia de otros oxidantes o reductores en la muestra se determinó de la siguiente manera: se estabiliza a temperatura de laboratorio agua de mar de superficie, se llenan varias botellas de muestreo de O<sub>2</sub> con ella, a cada una se le añaden los reactivos al revés, 1 ml de ácido sulfúrico, 1 ml de sosa/ioduro y 1 ml de cloruro manganoso. Se agita fuertemente y se pipetea 50 ml exactos. Una vez depositada en el vaso reactor se añade 1 ml de la disolución estándar de iodato potásico 0.01N (Seawater solutions, OSIL, Inglaterra). Se valora y se anota el volumen de tiosulfato gastado en el punto de equivalencia (V1, ml), y el volumen total de tiosulfato añadido en esta valoración (Vt, ml). Al acabar la reacción se añade otro ml de iodato potásico y se valora. Se anota el volumen de tiosulfato gastado en el punto de equivalencia (V2, ml).

El valor del blanco para una muestra de 100 ml sería 2\*V1-Vt-V2, al ser la muestra de 50 ml será la mitad, valor que se introduce en la ecuación (2).

Se realizan unos 5 blancos y se calcula la media.

### *Estandarización de la concentración del tiosulfato*

La normalidad del tiosulfato se determina contra la disolución estándar de iodato potásico 0.01N (Seawater solutions, OSIL, Inglaterra).

Se prepara agua de mar de la misma manera que para determinar el blanco. Una vez los 50 ml en el vaso reactor se añaden 10 ml del iodato 0.01N con una pipeta.

Se realizan unas 4 valoraciones del tiosulfato por cada lote.

La molaridad de la disolución de tiosulfato a 20 °C se calcula:

$$M_{S_{2}O_3} = \frac{10 * 0.01}{Vol_{S_{2}O_3} - Vol_{bla}} * \frac{\rho(20^{\circ}C)}{\rho(TLab)} \quad (1)$$

Donde:

$\text{Vol}_{\text{S}_2\text{O}_3}$  = volumen de tiosulfato gastado (ml).

$\text{Vol}_{\text{bla}}$  = volumen del blanco (ml).

La normalidad y la molaridad del tiosulfato son equivalentes, al realizar los análisis a temperatura de laboratorio estable todos los volúmenes de la fórmula (1) están referidos a la misma y la molaridad a la temperatura de laboratorio es igual a la de 20 °C que se introduce en la fórmula (2).

### *Valoración de las muestras*

Una vez las muestras están estabilizadas a la temperatura del laboratorio se procede a su análisis. Después de acidificar la muestra con 1 ml de ácido sulfúrico (5M) y agitar, se toma una alícuota de la muestra con la pipeta knudsen de volumen exacto 50 ml a 20 °C.

La alícuota se analiza mediante una valoración en vaso cerrado con una disolución de tiosulfato de sodio con una concentración nominal de 0.025 M. El punto final se detecta potenciométricamente con un electrodo de Pt/O<sub>2</sub> y un valorador tipo “Titrino Metrohm”. Los mililitros gastados de tiosulfato se convierten a O<sub>2</sub> en  $\mu\text{mol kg}^{-1}$  con la siguiente fórmula:

$$O_{2,(\text{mL/L})} = \frac{\left(\frac{V_x * V_{\text{bot}}}{V_{\text{Alic}}} - V_{\text{blc}}\right) * N_{\text{S}_2\text{O}_3} * 5598 - 1000 * DO_{\text{reg}}}{(V_{\text{bot}} - V_{\text{reac}})} \quad (2)$$

$$O_{2,(\mu\text{mol/kg})} = \frac{O_{2,(\text{mL/L})} * 44.66}{\rho(\text{Sal}, T_{\text{lab}}) / 1000} \quad (3)$$

Donde:

$V_x$  = volumen gastado de tiosulfato, normalizado a 20 °C (ml).

$V_{\text{bot}}$  = volumen aproximado de la botella (100 ml).

$V_{\text{blc}}$  = volumen de tiosulfato gastado en el blanco, normalizado a 20 °C (ml).

$N_{\text{S}_2\text{O}_3}$  = normalidad a 20 °C del tiosulfato.

$DO_{\text{reg}}$  = contenido en O<sub>2</sub> de los reactivos de fijación añadidos (0.0017 ml según Murray et ál. 1968).

$V_{\text{reac}}$  = volumen añadido de los reactivos (2 ml).

$\rho(\text{Sal}, T_{\text{lab}})$  = densidad en kg/m<sup>3</sup> del agua de mar a 1 atm de presión con la salinidad (Sal, psu) de la muestra y la temperatura del laboratorio ( $T_{\text{lab}}$ , °C).

Todos los volúmenes se refieren a 20 °C usando la siguiente ecuación:

$$V_{20} = V_{T_{\text{lab}}} * (1 + \alpha * (T_{\text{lab}} - 20)) \quad (4)$$

$$\alpha = (1 + 0.00000325)^3 - 1$$

Método de las adiciones estándar para el cálculo del blanco y la concentración del tiosulfato (Langdon, 2010).

Una alternativa en la determinación del blanco y la estandarización del tiosulfato, respectivamente es el siguiente:

- preparar varios matraces de  $O_2$  con agua de mar estabilizada a la temperatura del laboratorio tal y como se indicó anteriormente (añadiendo los reactivos al revés).
- tomar 50 ml con la pipeta knudsen.
- añadir 1ml de iodatos 0.01N, valorar.
- tomar otros 50 ml y añadir 1ml, valorar hacer esto 3 veces.
- tomar otros 50 ml y añadir 2 ml valorar, hacer esto 3 veces.
- tomar otros 50 ml y añadir 10 ml valorar, hacer esto 3 veces.
- estimar la regresión lineal tomando como Xs los ml de iodato añadidos y como Ys los  $\mu$ l de tiosulfato gastados.
- el blanco será la ordenada en el origen de esta regresión partido de dos.
- la normalidad del tiosulfato a 20 °C.

$$N_{S_2O_3} = 6000 * [M_{IO_3} \text{ (Tlab)} / \text{pendiente}] * [\rho \text{ (20 °C)} / \rho \text{ (Tlab)}] .$$

$$M_{IO_3} \text{ (Tlab)} = 0.01 * \rho \text{ (Tlab)} / \rho \text{ (20 °C)} .$$

Donde  $\rho$  es la densidad del agua pura a cierta temperatura.

## Reactivos u otro material fungible

Ver el apartado correspondiente de Dickson (1995) para las siguientes disoluciones:

- cloruro manganoso (3 M): disolver 600 gr de  $MnCl_{2.4}H_2O$  en agua destilada (1 l). Filtrar por un papel de filtro grueso.
- sosa (8 M) / yoduro de sodio (4 M): disolver 320 gr de NaOH en unos 500 ml de agua destilada, dejar que enfríe, luego añadir 600 gr de NaI y diluir hasta un volumen final de 1 l. Filtrar por un papel de filtro grueso.
- ácido sulfúrico (5 M). Adquirir ya el ácido diluido en botella de plástico.
- no se necesita la disolución indicadora de almidón .
- tiosulfato de sodio: preparar como en Dickson (1995) pero a una concentración de 0.025 M. Pesar 6.25 gr de  $Na_2S_2O_3.5H_2O$  en agua destilada, luego diluir hasta un volumen final de 1 l.
- yoduro potásico: se puede preparar como en Dickson (1995) pero con una concentración de 0.01 N o si no comprarla en OSIL SeaWater Solutions <http://www.seawatersolutions.com/iodate-standards-73-c.asp>.



## Control de calidad

### *Precisión de las medidas*

La exactitud de las medidas de oxígeno debe satisfacer los requerimientos WOCE, es decir, 0.5  $\mu\text{mol kg}^{-1}$  durante una campaña (una desviación estándar) y menos de 2  $\mu\text{mol kg}^{-1}$  entre campañas y entre laboratorios.

Se debe mantener un control de los blancos y del tiosulfato a lo largo de la campaña así como de la reproducibilidad.

La exactitud de los análisis de  $\text{O}_2$  viene principalmente determinada por el procedimiento de estandarización del tiosulfato. En cada lote de análisis se debe realizar ya que la concentración del tiosulfato varía con el tiempo, esta variación se debe mostrar en un gráfico en el informe correspondiente.

### *Reproducibilidad de las medidas*

Durante la campaña se deberían realizar análisis de replicados, varias muestras tomadas de la misma Niskin o muestras de distintas Niskin cerradas a la misma profundidad.

Más detalles se pueden encontrar en Dickson (1995).

## Otras técnicas similares

Existen variantes a esta técnica según el método de detección del punto final de la valoración, pudiendo ser potenciométrico como el descrito o espectrofotométrico.

## Referencias

- DICKSON, A. G. 1995. «Determination of dissolved oxygen in sea water by Winkler titration». *WOCE Operations Manual. Part 3.1.3 Operations & Methods, WHP Office Report WHPO 91-1*.
- LANGDON, C. 2010. «Determination of dissolved oxygen in seawater by winkler titration using the amperometric technique». *IOCCP Report N°14, ICPO publication series N 134*.
- MURRAY, C. N., J. P. RILEY, T. R. S. WILSON. 1968. «The solubility of oxygen in Winkler reagents used for the determination of dissolved oxygen». *Deep-Sea Res.* 15: 237-238.



# Determinación espectrofotométrica del pH mediante el uso de púrpura de *m*-cresol

<sup>1,2</sup>Pelejero, C.; <sup>2</sup>Calvo, E.; <sup>2</sup>Fernández-Vallejo, P.; <sup>2</sup>Movilla, J.; <sup>2</sup>López Sanz, A.;  
<sup>2</sup>Fernández-Guallart, E., <sup>3</sup>Horstkotte, B.; <sup>4</sup>Company, B.; <sup>4</sup>Álvarez, M.

<sup>1</sup>ICREA

<sup>2</sup>Institut de Ciències del Mar (CSIC)

<sup>3</sup>Instituto Mediterráneo de Estudios Avanzados (UIB-CSIC)

<sup>4</sup>C.O. A Coruña. Instituto Español de Oceanografía

## Conceptos generales

El pH del agua de mar, definido como el logaritmo, en signo negativo, de la concentración de protones ( $\text{pH} = -\log[\text{H}^+]$ ), es una variable crítica en los sistemas marinos. Pequeñas variaciones en el pH del agua de mar implican grandes cambios en la química marina, afectando, por ejemplo, la especiación de nutrientes, la complejación de metales y la estabilidad de las formas biogénicas de carbonato cálcico.

## Finalidad. Campo de aplicación

Esta técnica permite la determinación del pH del agua de mar en la escala total. La metodología descrita es una adaptación del método 'SOP 6b' del manual de Dickson et ál. (2007), basado en el trabajo de Clayton y Byrne (1993). En estas referencias, el lector encontrará más información sobre el fundamento teórico y campo de aplicación. Muy brevemente, esta técnica se basa en el cambio de color que experimenta una muestra de agua mezclada con el colorante púrpura de *m*-cresol en función del pH. Fundamentalmente, se trata de medir la mezcla de agua de mar con colorante a tres longitudes de onda específicas, que permiten conocer el pH del agua de mar. Este método es superior en precisión y exactitud a las técnicas potenciométricas, pudiéndose conseguir precisiones de hasta 0.0004 unidades de pH y exactitudes de hasta 0.002 unidades de pH (Millero, 2007).

## Equipamiento necesario

### *Muestreo*

- Cubetas cilíndricas de vidrio óptico especial de 10 cm de largo con dos tapones.
- Bandeja con espuma cortada a medida para almacenar las cubetas.
- Tubo de tygon o de silicona para el muestreo. En principio, se usará el mismo que para el muestreo para el análisis de oxígeno (véase el capítulo sobre el muestreo y análisis de oxígeno disuelto en agua de mar).

### *Análisis*

- Espectrofotómetro dotado de soporte termostatzado para cubetas cilíndricas (Shimadzu UV-2401 PC en el caso del *BIO Hespérides*, o Perkin Elmer Lambda 850 en el caso del *BIO Sarmiento de Gamboa*).
- Termómetro de varilla, para comprobar la temperatura de la muestra después del análisis.
- Incubador para cubetas cilíndricas.
- Baño termostático con tubos de goma y fundas aislantes para alimentar el soporte termostatzado del espectrofotómetro (primero) y el incubador (después).
- Solución de indicador.
- CRM.
- Multipipeta dosificadora con puntas, para administrar las alícuotas de solución de indicador.

## Reactivos u otro material fungible

### *Preparación de la solución de indicador*

- Disolver 0.4 gramos de púrpura de *m*-cresol en 500 ml de agua de CRM, que pueden ser restos (no es necesario abrir un frasco de CRM nuevo). De este modo conseguimos una solución de concentración 2mM de indicador. En las muestras añadiremos 50 µl de esta solución, de manera que las absorbancias no superen las 0.5 unidades.
- Para las campañas Malaspina, se preparará la solución de indicador previamente, con la que se llenarán botellas pyrex de 100 ml, que se cubrirán de papel de aluminio, para evitar la fotodegradación del indicador. A poder ser, se almacenarán las botellas en el frigorífico, pero no es imprescindible. Si es este el caso, aproximadamente una hora antes del análisis se sacará la botella para que adquiera la temperatura ambiental del laboratorio.

## Descripción de la técnica

### *Muestreo*

- Etiquetar adecuadamente las cubetas cilíndricas con la estación o cast y el número de la Niskin (utilizar celo o cinta blanca de electricista que no se despegue y se escribe bien, los rotuladores indelebles se borran).
- Colocar las cubetas en la bandeja con espuma recortada en un lugar no peligroso donde no se rompan ni tropiece la gente con ellos.
- Las muestras de agua de mar se toman justo después del muestreo de oxígeno disuelto, mediante las cubetas cilíndricas de 10 cm de largo.
- Teniendo la manguera de muestreo del oxígeno disuelto en el pitonero de la botella Niskin, colocar el otro extremo del tubo en una de las entradas de la cubeta cilíndrica.
- Abrir la botella Niskin, y enjuagar primero la cubeta un par de veces.
- Llenarla posteriormente hasta que rebose el agua dos o tres veces el volumen de la misma.
- Se debe evitar al máximo la formación de burbujas de aire, por lo que es conveniente, durante el muestreo, situar la salida del agua de la cubeta por encima de la entrada, procediéndose a tapar primero la salida y retirando luego el tubo de la toma de muestra, colocándose a continuación el segundo tapón, evitando que quede ninguna burbuja.
- Cerrar la Niskin.
- Una vez se han llenado todas las cubetas (una de cada botella Niskin), llevarlas al laboratorio y almacenarlas en el incubador durante 45 min como mínimo.
- Antes de ponerlas al incubador es importante comprobar que no hay burbujas de aire dentro del circuito interno de agua. Para eliminarlas, basta con decantar un poco toda la caja del incubador con la salida del agua hacia arriba y el circuito de agua en funcionamiento para que vayan saliendo.
- También es muy importante comprobar que hay suficiente agua en el baño termostático. Con los movimientos del barco es fácil que el baño se vacíe un poco y no atempere correctamente.
- Sobre todo para las cubetas que contienen aguas profundas y frías, es conveniente girar un poco los tapones por si se dilata el líquido interior (si los tapones quedan demasiado apretados y resacos, hay riesgo de que se rompan las cubetas por los extremos debido a la dilatación).

### *Análisis por espectrofotometría*

- Encender el espectrofotómetro con antelación a la realización de las medidas, a poder ser 2 horas antes. Encender las dos lámparas, la de deuterio y la normal.

- Empezar a medir las muestras cuando ya lleven, como mínimo, 45 minutos en el incubador.
- Si el espectrofotómetro es de doble haz, podemos dejar el haz de referencia vacío o añadir una cubeta de referencia con agua Milli-Q o con agua de mar. Si hay una cubeta dentro del equipo, es importante sacarla cuando se reinicia el espectrofotómetro.
- Limpiar bien la cubeta, introducirla en el soporte del espectrofotómetro y hacer línea de base en todo el rango, de 740 a 400 nm.
- Es importante poner las cubetas en el soporte siempre con la misma orientación, por ejemplo, con la marca de la cubeta en la parte anterior.
- Sacar la cubeta, abrir un tapón, añadir solución de indicador (50  $\mu$ l) por el orificio, sumergiendo la punta de la pipeta hasta mitad de la cubeta, abrir el otro tapón y cerrar con este el orificio por el cual introdujimos el indicador. Tapar el otro orificio con el tapón sobrante, secar el líquido de muestra que se pueda derramar, agitar bien la cubeta con la mezcla, limpiar de nuevo los extremos de la cubeta con papel si es necesario, volverla a introducir en el soporte y leer a las tres longitudes de onda de 434, 487.6, 578 y 730 nm, tres veces.
- Si la absorbancia a la banda de referencia de 730 nm sale alta ( $>0.01$ ), es probable que no esté bien puesta la cubeta, que esté sucio uno de los cristales o que haya una burbuja en la pared. Limpiar otra vez los extremos de la cubeta, colocar bien en el soporte y volver a leer.
- Con el termómetro de varilla, medir la temperatura de las cubetas después de leer con el espectrofotómetro. Apuntar este valor para el cálculo del pH. El valor debería ser muy cercano a 25 °C. Si se observan valores de temperatura  $\sim 0.2$  °C por encima o por debajo de 25 °C, se deberá modificar la temperatura del baño para corregir la diferencia observada. Se debe tener en cuenta que durante la manipulación de limpiado, secado y agitación de la cubeta con la muestra, e incluso dentro del espectrofotómetro, se produce un calentamiento de la muestra. Por ello, podría ser necesario fijar inicialmente la temperatura del baño un poco por debajo de 25 °C (24.5 – 24.8 °C).
- Guardar los datos en un archivo nombrado por la estación, cada muestra debe ir identificada con el número de botella.
- Para el cálculo de la perturbación del pH que ocurre al añadir el indicador, deberemos calcular una  $\Delta R$  [ $R=(A_{578}-A_{730})/(A_{434}-A_{730})$ ] añadiendo dos veces el indicador en cuatro o cinco muestras de la roseta de profundidad, repartidas entre fondo y superficie, para tener un buen rango de variación del pH. Es importante hacer estas adiciones en cada estación, para obtener la variación del  $\Delta R$  con el pH para cada lote de indicador.

## Control de calidad

### *Determinación de la exactitud de las medidas*

- Una vez a la semana abriremos un frasco de CRM y llenaremos todas las cubetas que podamos, directamente de la botella (aunque se derrame un poco de líquido), sin sifonar. Para aprovechar al máximo el CRM, el lavado de las cubetas lo haremos pasando el CRM enjuagado de una cubeta a la siguiente. Deberíamos poder llenar unas 13 cubetas con una botella de CRM.
- De esta forma, a partir de los datos de alcalinidad, DIC, salinidad y nutrientes certificados del CRM, podremos calcular el pH real del CRM, y comprobar la exactitud de nuestras medidas.

### *Determinación de la reproducibilidad de las medidas*

- Lo ideal es analizar repetidamente aguas profundas, que son las más estables, por ejemplo una botella de 2.000 m de profundidad, o la más profunda de la roseta.
- Lo ideal es analizar la reproducibilidad una vez por semana, llenando unas 10 cubetas.
- A las malas, si hay escasez de agua profunda, se puede hacer con agua subestándar del bidón, o de un bidón especial, por ejemplo de 5 l, que se debería llenar días antes con agua del continuo y sin *head space*, para que se haya ido homogenizando y equilibrando.
- Un ejemplo del cálculo de reproducibilidad hecho de esta manera en una campaña lo podemos encontrar en Álvarez et ál. (2009), donde obtuvieron reproducibilidades de 0.0009 unidades de pH (promedio de las desviaciones estándar de la campaña).

### *Desfase constante de las medidas de pH espectrofotométrico*

- Según demostraron Del Valls y Dickson (1993), debido a inconsistencias en las determinaciones de las constantes de disociación de las soluciones de púrpura de *m*-cresol, las medidas de pH espectrofotométrico deben corregirse con la adición constante de 0.0047 unidades de pH (Millero, 2007). Debe indicarse perfectamente en el informe qué tipo de correcciones se han realizado sobre los valores de pH, la escala y la temperatura en la que se calculan.

## Referencias

- ÁLVAREZ, M. et ál. 2009. «Estimating the storage of anthropogenic carbon in the subtropical Indian Ocean: a comparison of five different approaches». *Biogeosc* 6: 681-703.

- CLAYTON, T. D., R. H. BYRNE. 1993. «Spectrophotometric seawater pH measurements: total hydrogen ion concentration scale calibration of *m*-cresol purple and at-sea results». *Deep-Sea Res.* I 40: 2115-2129.
- DEL VALLS, T. A., A. G. DICKSON. 1998. «The pH of buffers based on 2-amino-2-hydroxymethyl-1,3-propanediol ("tris") in synthetic sea water». *Deep Sea Res.* I 45: 1541-1554.
- DICKSON, A. G., C. L. SABINE, J. R. CHRISTIAN (eds.) 2007. *Guide to best practices for ocean CO<sub>2</sub> measurements. PICES Special Publication 3*, 191 pp.
- MILLERO, F. J. 2007. «The marine inorganic carbon cycle». *Chem. Rev.* 107: 308-341.



## Determinación de la alcalinidad mediante valoración rápida a doble punto final

<sup>1,2</sup>Pelejero, C.; <sup>2</sup>Calvo, E.; <sup>2</sup>Fernández-Vallejo, P.; <sup>2</sup>Movilla, J.; <sup>2</sup>López Sanz, A.;  
<sup>2</sup>Fernández-Guallart, E.; <sup>3</sup>Horstkotte, B.; <sup>4</sup>Company, B.; <sup>4</sup>Álvarez, M.

<sup>1</sup>ICREA

<sup>2</sup>CSIC Institut de Ciències del Mar (CSIC)

<sup>3</sup>Instituto Mediterráneo de Estudios Avanzados (UIB-CSIC)

<sup>4</sup>C.O. A Coruña. Instituto Español de Oceanografía

### Conceptos generales

Existen diversas definiciones de la alcalinidad del agua de mar, un concepto cuyo desarrollo científico histórico se encuentra bien detallado en Dickson (1992).

La alcalinidad hace referencia a la capacidad del agua para neutralizar ácidos, y puede definirse rigurosamente, según Dickson (1981), como el nombre de moles de protones equivalentes al exceso de aceptores de protones (bases formadas de ácidos débiles con una constante de disociación  $K \leq 10^{-4.5}$  a 25 °C y fuerza iónica cero) sobre donantes de protones (ácidos con  $K > 10^{-4.5}$ ) en 1 kilogramo de muestra. Así entonces, la alcalinidad (A) de la muestra vendría determinada por:

$$A = [\text{HCO}_3^-] + 2[\text{CO}_3^{2-}] + [\text{B}(\text{OH})_4^-] + [\text{OH}^-] + [\text{HPO}_4^{2-}] + 2[\text{PO}_4^{3-}] + [\text{H}_3\text{SiO}_4^-] + [\text{NH}_3] + [\text{HS}^-] + \dots - [\text{H}^+] - [\text{HSO}_4^-] - [\text{HF}] - [\text{H}_3\text{PO}_4] \dots$$

donde los puntos suspensivos hacen referencia a especies adicionales minoritarias básicas o ácidas que, o no se han identificado todavía, o existen en tan pequeñas cantidades que pueden considerarse despreciables.

### Finalidad. Campo de aplicación

La alcalinidad es un parámetro muy importante y útil en el contexto del sistema del carbonato en agua de mar. Es uno de los parámetros de este sistema que se pueden medir y que, en combinación con otro parámetro adi-

cional (e.g. pH, pCO<sub>2</sub> o carbono inorgánico disuelto), permite determinar el resto de los parámetros. Análisis precisos de variaciones en la alcalinidad permiten, asimismo, realizar estimaciones sobre calcificación de los organismos marinos calcificadores.

Tradicionalmente, el análisis de alcalinidad en agua de mar implica la realización de una valoración completa de la muestra mediante una solución de ácido clorhídrico y la posterior evaluación computerizada de la curva de valoración, para la determinación del punto final. Esta valoración puede realizarse en un matraz cerrado (método 'SOP 3a' del manual de Dickson et ál. (2007)) o abierto (método 'SOP 3b' del manual de Dickson et ál. (2007)). Estos métodos, no obstante, son relativamente lentos (~30 min por muestra), limitando críticamente su aplicabilidad en campañas oceanográficas con gran número de muestras.

En el contexto de la Expedición Malaspina, realizaremos los análisis de alcalinidad mediante una valoración mucho más rápida (~ 2 a 3 min por muestra), siguiendo el método desarrollado por Pérez y Fraga (1987), modificado posteriormente por Pérez et ál. (2000). En estas referencias, el lector encontrará más información sobre el fundamento teórico y el campo de aplicación. Muy brevemente, esta técnica consiste en la realización de una valoración rápida a punto final en un matraz abierto, después de calibrar el electrodo a pH 4.4 (escala NBS), mediante la utilización de un tampón de ftalato potásico-bórax. Mediante la intercalación de medidas de material certificado (CRMs) entre los análisis de muestras, este método permite alcanzar precisiones y exactitudes del orden de 1 – 2 µmol/kg.

## Equipamiento y fungible necesario

### *Muestreo*

- Tubo de tygon o de silicona para el muestreo. En principio, se usará el mismo que para el muestreo para el análisis de oxígeno y de pH (véase los capítulos sobre muestreo y análisis de O<sub>2</sub> disuelto y pH en agua de mar).
- Frascos de 500 ml de borosilicato con tapón esmerilado.
- Cajas de plástico (estilo para cervezas) para almacenar los frascos de 500 ml (con espacio para unas 12 botellas por caja).

### *Análisis*

- Titrande 808 de Metrohm con bureta de 5 ml.
- Electrodo 6.0257.000 Aquatrode plus con sonda de temperatura Pt1000.
- Pipetas Knudsen de 195 ml.
- Bomba de vacío con trampa.

- Matraces (erlenmeyers) de valoración.
- Imanes.
- Matraz aforado de 5 l, con divisiones de ml antes y después de la marca de 5 l, por si nos pasamos o no llegamos a este volumen.
- Termómetro de varilla.
- Ordenador portátil para operar el Titrande desde él. El titrande también se puede controlar desde teclados táctiles específicos, pero es más cómodo trabajar desde el portátil, tal y como haremos en la Expedición Malaspina.
- 2 bidones de agua subestándar de 25 l.
- Soporte y pinza para la pipeta Knudsen.
- Cinta aislante para unir el electrodo y la bureta del Titrande una vez corten bien.
- Cinta americana y cordinos para trincar bien el bidón, equipos, etc.
- Bolsas de basura negras para tapar el bidón de 25 l.

## Reactivos y preparación de soluciones

### *Productos químicos necesarios:*

- Solución comercial de electrolito (KCl) para llenar los electrodos, en concreto KCl 3 mol/L Metrohm, botella de 250 ml Ref.: 6.2308.020.
- Jeringas de Fixanal con 0.5 moles de HCl certificados (Riedel-de-Haën).
- Tetraborato de sodio decahidratado ( $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ ).
- Ftalato potásico ( $\text{C}_8\text{H}_5\text{KO}_4$ ).

### *Preparación de la solución de ácido clorhídrico para las valoraciones*

- La solución de HCl la prepararemos con agua destilada, (no Milli-Q), ya que esta última normalmente contiene microburbujas generadas durante el proceso de purificación.
- Enjuagaremos antes el matraz diversas veces con agua destilada para eliminar restos de HCl que hayan podido quedar de la solución anterior.
- Siguiendo las instrucciones del producto comercial Fixanal, abriremos una jeringa de 0.5 moles de HCl certificado y lo introduciremos en el matraz aforado de 5 litros para obtener una disolución de HCl 0.1 molar.
- Añadiremos el HCl (jeringa) sobre cierto volumen de agua destilada en el matraz, continuaremos pasando agua a través de la jeringa hasta casi llenar el matraz, y enrasaremos a 5 l o muy cerca (zona de divisiones de ml marcadas), apuntando el volumen exacto.
- Mediremos la temperatura con el termómetro de varilla, y la apuntaremos. Con este dato y el del volumen se podrá calcular, durante el

análisis de datos (hoja excel y macros ya preparados), la concentración exacta de HCl teniendo en cuenta los cambios de dilatación debidos a la temperatura.

- Agitaremos bien la solución y la dejaremos reposar, preferiblemente un día como mínimo.
- En el caso concreto de la Expedición Malaspina, suponiendo que analizamos 14 profundidades de la columna de agua, por duplicado, añadiendo 3 CRM y 10 aguas subestándar, y consumiendo unos 5 ml de solución de HCl por valoración, implica que los 5 l de solución alcanzarán para unos 25 días (200 ml de solución por día). En cada leg, por lo tanto, se deberán preparar aproximadamente dos veces las soluciones de HCl.
- Podemos apurar el HCl hasta el final, pero es importante no terminarlo durante el análisis de una tanda. Por lo tanto, si ya queda poco, mejor hacer de nuevo antes de empezar la tanda. De hecho, ya que hay que dejarlo reposar durante al menos un día, preveer con antelación la cantidad de ácido que se va a necesitar para procesar la siguiente tanda de muestras.

#### *Preparación de la solución tampón de ftalato potásico-bórax para la calibración del electrodo a pH 4.4*

- En el contexto de la Expedición Malaspina, prepararemos cantidad suficiente de este tampón para toda la campaña antes de su inicio, y la almacenaremos en botellas pyrex de 100 o 200 ml, que guardaremos en el frigorífico.
- Este tampón lo prepararemos con agua sin CO<sub>2</sub>, utilizando agua de mar ya valorada después del análisis de alcalinidad, que dejaremos una noche burbujeando con nitrógeno para eliminar cualquier traza de CO<sub>2</sub>.
- Disolveremos 1,5257g de bórax (tetaborato de sodio decahidratado, Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub>·10H<sub>2</sub>O) y 4,085g de ftalato potásico (C<sub>8</sub>H<sub>5</sub>KO<sub>4</sub>) en 1 l de agua sin CO<sub>2</sub>, y agitaremos.

#### *Agua subestándar para el bidón de 25 l*

- El primer bidón se llenará una vez el barco ya esté situado a mar abierto, para conseguir aguas con menos influencia costera y menor carga en nutrientes inorgánicos. Llenaremos el bidón con agua del sistema en continuo, y lo cubriremos con una bolsa de basura negra, para evitar procesos de fotosíntesis. En principio debería dejarse equilibrar 2 días antes de su uso. Por ello, utilizaremos dos bidones de 25 l, para poder llenar un segundo con tiempo para que se equilibre cuando hagamos cambio de bidón.

## Descripción de la técnica

### *Muestreo*

- Etiquetaremos adecuadamente los frascos con un número fijo, que luego relacionaremos en cada caso con cada estación o *cast* y el número de la Niskin, a través de un estadillo (utilizaremos celo o cinta blanca de electricista que no se despega y se escribe bien, los rotuladores indelebles se borran).
- Si se rompiera alguna botella la podríamos sustituir por los CRM vacíos, tras haber retirado la grasa del cuello y del tapón.
- Colocaremos la caja de plástico con todos los frascos en un lugar no peligroso donde no se rompan ni tropiece la gente con ellos.
- Las muestras de agua de mar para alcalinidad las tomaremos justo después del muestreo de pH, que se toma justo después del muestreo para oxígeno disuelto.
- Teniendo la manguera de muestreo del oxígeno disuelto en el pitirro de la botella Niskin, colocaremos el otro extremo del tubo en el fondo del frasco de 500 ml.
- Abriremos la botella Niskin y enjuagaremos los frascos y el tapón dos veces con el agua de la Niskin.
- Tomaremos la muestra llenando el frasco hasta arriba, dejando rebozar al menos 1/3 de la botella, e intentando evitar la formación de burbujas.
- Cerraremos la Niskin.
- Cerraremos bien el frasco y guardaremos, si es posible, en la oscuridad.
- Antes de guardar las botellas y tras asegurarnos que están bien cerradas, es conveniente pasarles un poco de agua dulce por fuera para evitar la acumulación de sal en el tapón y cuello de la botella (podrían contaminar la muestra en el momento de abrirlas para su valoración).
- Dejaremos estabilizar las muestras un mínimo de 4 o 5 horas antes de analizar, para que se atemperen con el laboratorio. No fijaremos las muestras con  $\text{HgCl}_2$ , ya que estas se procesarán 1 o 2 días después del muestreo, como máximo. Con el fin de ahorrar CRM, conviene acumular un número importante de botellas y valorarlas todas el mismo día.

NOTA: no se lavará nunca con agua dulce el interior de los frascos a menos que tengan mucho *fouling* en el fondo, o no se hayan utilizado en mucho tiempo.

### *Valoración con el Titrandó*

#### CALIBRACIÓN DEL ELECTRODO CON EL TAMPÓN DE pH 4.4

- Antes de empezar los análisis deberemos sacar el tampón de pH 4.4 de la nevera para que se estabilice a temperatura ambiente (unos 20 minutos).
- Dejaremos inicialmente el electrodo del Titrandó sumergido en el tampón viejo del día anterior unos 15 minutos. Abriremos antes el taponcillo del electrodo (al final del análisis deberemos acordarnos de cerrarlo de nuevo).
- Una vez el tampón nuevo esté estabilizado a temperatura ambiente, dejaremos el electrodo del Titrandó sumergido en el tampón de pH 4.4 unos 20 minutos para que se estabilice.
- Apuntaremos la temperatura del laboratorio.
- Encenderemos el ordenador portátil, conectaremos el Titrandó al portátil por USB, y abriremos el programa TIAMO.
- Iremos a la opción [Method]. En “File”, “open”, buscaremos el método “CAL”.
- Iremos a la opción [Workplace]. Introduciremos la identificación y el método “CAL”.
- Con el electrodo sumergido en el tampón de pH 4.4, le daremos al “Start” en el programa de calibración.
- Obtendremos el valor de la temperatura, el pH y el potencial. El programa ya tiene memorizada la tabla de la relación pH vs T, obtenida a partir de la ecuación publicada por Pérez et ál. (2000),  $pH_{NBS} = 4.413 - 0.00059 \cdot (T - 25)$ .

#### VALORACIÓN

- Agitaremos el matraz de ácido clorhídrico.
- Desde el portátil, cerraremos el método de calibración (opción [Method], “Close” el método “CAL”).
- Abriremos el método alcalinidad (opción [Method], “File”, “open” y buscaremos el método “alcalinidad”).
- Iremos a la opción [Workplace]. Entraremos los siguientes datos:

Identificación 1: fecha.

Identificación 2: Estación y número de botella.

Método: alcalinidad.

- Colocaremos bien la bureta y el electrodo para que corte bien, y la valoración tarde entre 2 y 3 minutos. La punta de la bureta debe quedar próxima al electrodo, de manera que este sea muy sensible a la adición de HCl. Una vez el sistema corta bien, fijaremos la posición

del electrodo y la bureta con cinta aislante, para que no se nos mueva la configuración entre muestra y muestra.

- El volumen de agua a valorar será siempre constante, y lo obtendremos mediante succión con una pipeta Knudsen (de volumen calibrado) conectada a una bomba de vacío. Antes de empezar a realizar valoraciones deberemos familiarizarnos con el grado de succión de la bomba, para evitar turbulencias y burbujeos durante la extracción de muestra (es importante abrir la llave poco a poco).
- Cuando introduzcamos la muestra succionada en la pipeta dentro del matraz de valoración, tocaremos la pared superior del matraz (no la muestra), y esperaremos siempre el mismo tiempo al final (e.g. 1 segundo). Es conveniente que el llenado se realice siempre de la misma manera, para tener volúmenes lo más reproducibles posible.
- Una vez depositada la muestra, limpiaremos la punta de la pipeta con papel de laboratorio.
- Entre muestra y muestra, nunca lavaremos el electrodo.
- Para empezar a valorar la solución en el matraz, provisto de un imán, le daremos al botón 'start'.
- Las primeras valoraciones las haremos con agua del continuo (podemos llenar una botella de agua mineral de 1.5 l, despacio evitando el burbujeo), hasta que corte bien, y obtengamos una buena reproducibilidad en los volúmenes de HCl utilizados para llegar a los dos puntos finales. Durante estas primeras valoraciones, aprovecharemos para eliminar cualquier burbuja de aire que haya podido quedar atrapada en el sistema de succión de HCl, tocando un poco los tubos para que vayan saliendo. Opcionalmente, también existe una función para realizar un lavado de la bureta mediante la expulsión de una cantidad de HCl (en "workplace", abrir la pestaña "Tools", ir a "Manual control", "Dosing device 1", "prepare" y presionar "START". Poner la bureta en una jarrita, dejar que complete 2 o 3 ciclos y presionar "STOP").
- Para que corte bien y haga la valoración entre 2 y 3 minutos, puede ser importante cambiar el volumen inicial de HCl que añade el titrando, que se puede modificar mediante el *software* del equipo ('Main conditions', 'Start conditions', cambiar el valor y, muy importante, 'grabar'). Dependiendo de la alcalinidad de cada zona oceánica, puede que debamos cambiar este volumen inicial a lo largo de la campaña o de cada transecto. De hecho, a veces es incluso necesario ajustarlo en la misma estación, cuando hay mucha diferencia entre aguas profundas y superficiales). Como indicación, el pH resultante después de añadir el volumen inicial debe ser próximo a 5.
- Es importante observar el valor de pH que nos da el electrodo cuando empieza la valoración. Si, por equivocación, estamos valorando una muestra ya valorada, lo veremos así rápidamente. En este caso, parar 'Stop' inmediatamente, ya que el sistema continuaría aña-

diendo HCl sin parar, al no alcanzar el punto final (según como se haya programado en sistema, puede saltar una pantalla avisándote si pones una muestra ya valorada).

- Una vez corte bien, valoraremos cuatro muestras de agua subestándar del bidón de 25 l y, si obtenemos buena reproducibilidad, pasaremos ya a los CRM. Si no, podemos pasar alguna muestra más de agua subestándar hasta obtener buenos resultados.
- Valoraremos tres CRM, para lo cual, seguramente, no bastará solo con una botella.
- Valoraremos las muestras de la estación.
- Al final de la secuencia, valoraremos de nuevo 3 muestras de agua subestándar del bidón, para poder corregir posibles derivas.
- Si, por alguna razón, tenemos que parar a media tanda, es conveniente pasar siempre 4 o 5 muestras de agua subestándar del bidón, para hacer los cálculos de deriva al final. Y antes de continuar los análisis después de la pausa, también pasaremos 4 o 5 muestras del agua subestándar (es conveniente hacer turnos y evitar así paradas largas, siempre que las condiciones lo permitan).
- Si analizamos dos estaciones seguidas, también pasaremos 2 o 3 muestras de agua del bidón entre estación y estación.
- Después de valorar cada muestra, vaciaremos el contenido del matraz vigilando no perder el imán, para lo cual nos ayudaremos con otro imán.
- Al terminar la tanda de análisis, si no hay peligro de derrame por el movimiento del barco, podemos dejar el electrodo sumergido en la solución tampón hasta la próxima tanda de análisis, con el tapón cerrado para que no se evapore el electrolito.

#### CAMBIO DEL AGUA DEL BIDÓN

- Cambiaremos el agua del bidón de 25 l cuando el nivel esté aproximadamente por debajo de 1/3 de su capacidad.
- Cuando lo hagamos, analizaremos 5 o 6 subestándares viejos seguidos de 2 o 3 CRM, y de 5 o 6 subestándares nuevos.

#### CAMBIO DE LA SOLUCIÓN DE HCl

- Conviene hacerlo en un día diferente que el cambio del subestándar, al menos con dos días de diferencia. Lo haremos analizando primero 5 muestras de agua subestándar con el HCl viejo, después de las cuales cambiaremos la solución de HCl, lavaremos la bureta desde la opción 'Configuration' del *software* Tiamo, y analizaremos 3 o 4 muestras de cualquier agua de mar, seguidas de 5 muestras de subestándar y 2 o 3 muestras de CRM.



## Control de calidad

### *Determinación de la exactitud de las medidas*

La exactitud de las medidas se evalúa siguiendo la evolución temporal de los análisis de CRM de cada lote de análisis de muestras. Se compara el valor medido con el valor certificado, la diferencia no debe ser mayor de  $2 \mu\text{mol kg}^{-1}$ . La exactitud puede calcularse como la media de las diferencias entre los valores de alcalinidad medidos y certificados de las CRM de todos los lotes de cada leg de Malaspina. Ver el material del apéndice en Álvarez et ál. (2009).

### *Determinación de la reproducibilidad de las medidas*

La reproducibilidad se evalúa de dos modos distintos:

- 1) Análisis de alcalinidad de muestras (unas 5) tomadas de la misma botella preferiblemente de aguas profundas, que son las más estables, por ejemplo una botella de 2.000 m de profundidad, o la más profunda de la roseta. Esto se podría hacer dos veces en cada leg.
- 2) Análisis de alcalinidad de muestras tomadas de distintas botellas (de 2 a 5) pero cerradas a la misma profundidad en aguas profundas. Este ejercicio es poco probable que se pueda realizar en Malaspina donde la disponibilidad de agua y tiempo están muy ajustados.
- 3) Cada muestra se analiza dos veces por lo tanto tendremos una media y una desviación estándar para cada muestra dentro de cada lote de análisis. Estas desviaciones estándar dan una idea de la reproducibilidad para cada lote y estudiándolas en conjunto para cada leg.

## Referencias

- ÁLVAREZ, M. et ál. 2009. «Estimating the storage of anthropogenic carbon in the subtropical Indian Ocean: a comparison of five different approaches». *Biogeosc.* 6: 681-703.
- DICKSON, A. G. 1981. «An exact definition of total alkalinity and a procedure for the estimation of alkalinity and total inorganic carbon from titration data». *Deep Sea Res. A* 28: 609-623.
- DICKSON, A. G. 1992. «The development of the alkalinity concept in marine chemistry». *Mar. Chem.* 40: 49-63.
- DICKSON, A. G., C. L. SABINE, J. R. CHRISTIAN (eds.). 2007. *Guide to best practices for ocean CO<sub>2</sub> measurements. PICES Special Publication 3*, 191 pp.
- PÉREZ, F. F., F. FRAGA. 1987. «A precise and rapid analytical procedure for alkalinity determination». *Mar. Chem.* 21: 169-182.
- PÉREZ, F. F., A. F. RÍOS, T. RELLÁN, M. ÁLVAREZ. 2000. «Improvements in a fast potentiometric seawater alkalinity determination». *Cienc. Mar.* 26: 463-478.



# Muestreo de nutrientes inorgánicos disueltos (DIN), nitrógeno (TN) y fósforo (TP) totales

Vidal, M.; Teixidor, I.; Galindo, M.

*Departament d'Ecologia, Universitat de Barcelona*

## Finalidad. Campo de aplicación

Recogida de muestras de agua para la determinación de las concentraciones de nutrientes inorgánicos disueltos (DIN = nitrato, nitrito, fosfato, silicato) a través de autoanalizador, de fosfato a través de un método manual con cubeta de 10 cm de paso de luz, y de nitrógeno y fósforo total (TN y TP, respectivamente). El análisis de fosfato incluye también una parte indeterminada de fósforo lábil que junto con el fosfato forman el fósforo reactivo soluble (SRP, de su acrónimo en inglés).

## Conceptos generales

Los elementos nutritivos están implicados en la producción de materia orgánica mediante fotosíntesis en la capa superficial de los océanos. Su disponibilidad y distribución en formas inorgánicas, orgánicas disueltas y particuladas juega un papel esencial en los flujos y exportación de carbono.

## Equipamiento necesario

Nevera portátil.

## Reactivos u otro material fungible

- Tubo de silicona.
- Botellas Nalgene de policarbonato de 1L, oscurecidas con cinta opaca.

- Botellas pyrex de tapón de rosca y teflón (color rojo) de 50 ml.
- Botellas de borosilicato de tapón blanco de 60 ml.
- Botellas de plástico Nalgene de 60 ml.
- Probetas de vidrio de 0.25 l.
- Probetas de plástico de 0.1 l, 0.25 l, 0.5 l, 1 l.
- Probetas de vidrio de 10 ml, 25 ml, 50 ml.
- Matraz aforado de 1 l.
- Botellas de polietileno de 1 l, 0.2 l, 0.1 l.
- Tubos de polipropileno de 12 ml estériles.

### *Reactivos*

- (1) Ácido clorhídrico.

### **Descripción de la técnica**

(0<sub>1</sub>) Todo el material debe lavarse previamente en ácido diluido y aclararse 3 veces con agua Milli-Q.

(0<sub>2</sub>) Para evitar al máximo la posibilidad de contaminación, las botellas de muestreo estarán numeradas y se usarán siguiendo el mismo orden.

(1) Conectar un tubo de silicona acabado en un prefiltro de 200 directamente a la Niskin.

(2) Dejar pasar unos 200 ml de muestra.

(3) Aclarar la botella de muestreo (Nalgene de 1 l) 2 veces con la propia muestra.

(4) Recoger la muestra. Evitar el contacto de la botella de muestreo con superficies sucias (no depositar directamente en el suelo).

(5) Mantener las muestras protegidas de la luz natural y refrigeradas (en nevera portátil) durante el muestreo de la roseta.

(6) En el laboratorio, recoger las submuestras para las distintas determinaciones. Los recipientes deben aclararse dos veces con la muestra antes de llenarse. Mantener siempre los tubos y botellas en posición vertical. No tocar con los dedos el interior de las botellas y tapones. Se recogerá una muestra en una botella de policarbonato Nalgene de 60 ml y se congelará inmediatamente hasta la comprobación de todos los resultados. El resto de muestras se recogerán como se indica a continuación:

*SRP* (método manual). Llenar 1 botella de vidrio de tapón de rosca blanco con 50 ml. Las muestras se mantendrán refrigeradas hasta el momento de su análisis que no se demorará más de unas horas.

*TP*. Se analiza a partir de la oxidación de la muestra y posterior análisis del fosfato resultante por el método manual de análisis de SRP. Llenar 2

botellas pyrex de 50 ml de tapón de rosca y junta de teflón con 30 ml de muestra. Añadir los reactivos de oxidación y proceder con el método de oxidación de fósforo total (TP).

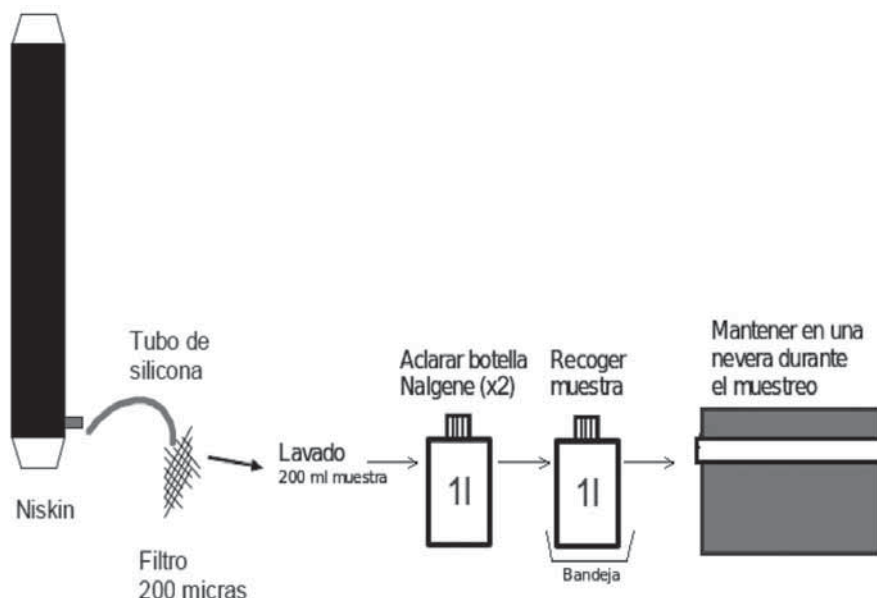
*TN.* Se analiza a partir de la oxidación de la muestra y posterior análisis del  $\text{NO}_3$  a través de autoanalizador. Llenar 2 botellas pyrex de 50 ml de tapón de rosca y junta de teflón con 10 ml. Añadir los reactivos de oxidación y proceder con el método de oxidación de nitrógeno total (TN).

*DIN.* Llenar los tubos de polipropileno de 12 ml estériles y proceder con el método de análisis de nutrientes inorgánicos mediante autoanalizador.

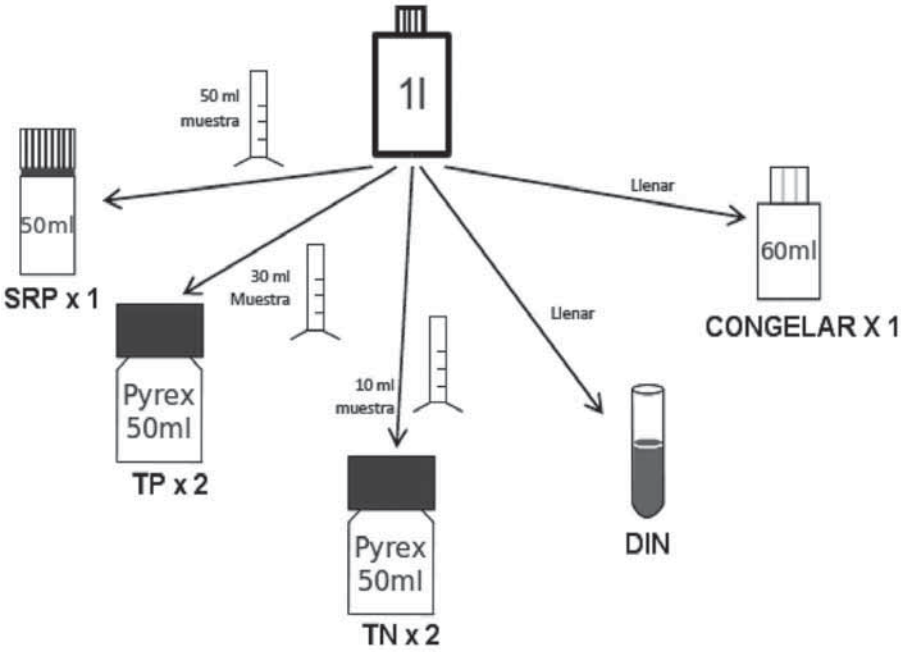
*En caso de que no sea posible el análisis inmediato, las muestras se recogerán en botellas de polietileno o policarbonato y se congelarán inmediatamente.*

### Cuadro sinóptico de la técnica

#### *Muestreo:*



*Recogida de submuestras:*



# Muestreo y análisis de nutrientes inorgánicos disueltos en agua de mar

<sup>1</sup>Blasco, D.; <sup>1</sup>De La Fuente Gamero, P.; <sup>3</sup>Galindo, M.

<sup>1,2</sup>Servicio de Análisis de Nutrientes del ICM (CSIC)

<sup>1</sup> *Institut de Ciències del Mar (CSIC)*

<sup>2</sup> *Laboratori d'Anàlisi de Nutrients, Institut de Ciències del Mar (CSIC)*

<sup>3</sup> *Universitat de Barcelona, UB*

## Finalidad. Campo de aplicación

Determinación de la concentración de nutrientes inorgánicos disueltos (Nitrato, Nitrito, Fosfato y Silicato) en agua de mar.

## Conceptos generales

El nitrato, fosfato y silicato son consumidos durante la fotosíntesis por el fitoplancton de las aguas superficiales por lo que son fundamentales para mantener la producción primaria de los océanos. A su vez, a través de la bomba biológica y mediante procesos de re-mineralización en la columna de agua juegan un papel esencial en los flujos y exportación de carbono.

## Equipamiento necesario

### *Muestreo*

- Guantes látex sin polvo.
- Tubos de muestra 13 ml.
- Gradillas.
- Cámara de -20 °C.

### *Preparación y conservación de reactivos, patrones y surfactantes*

- Botellas Pyrex de rosca y tapón azul (50 ml).
- Pipetas 0.1, 1, 5 ml.

- Pipetas Pasteur.
- Puntas de pipeta plástico y cristal.
- Guantes de látex y nitrilo.
- Parafilm.
- Guantes de nitrilo.
- Gafas.
- Matraces aforados plástico 100, 250, 500, 1000 ml.
- Vasos de precipitado vidrio y plástico 100, 500 ml.
- Agitador eléctrico.
- Medidor de pH.
- Probetas de vidrio y plástico 1000 ml.
- Botellas de plástico opaco 250, 500, 1000 ml.
- Patrones estándar de Nitrato, Nitrito, Silicato y Fosfato (10000  $\mu\text{M}$ ).
- Ácido oxálico  $\text{H}_2\text{C}_2\text{O}_4$ .
- Ácido ascórbico  $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6$ .
- Ácido Sulfúrico  $\text{H}_2\text{SO}_4$ .
- Ácido Clorhídrico  $\text{HCl}$ .
- Ácido fosfórico  $\text{H}_3\text{PO}_4$ .
- Acetona  $\text{C}_3\text{H}_6\text{O}$ .
- Amoníaco  $\text{NH}_3$ .
- Cloruro amónico  $\text{NH}_4\text{Cl}$ .
- Molibdato de amonio  $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ .
- Brij-35.
- Cloruro de sodio  $\text{NaCl}$ .
- FDD6.
- Dihidrocloruro de N-1 Naftileteileno de diamina (NED)  $\text{C}_{12}\text{H}_{14}\text{N}_2 \cdot 2\text{HCl}$ .
- Dodecilsulfato de Sodio (SDS).
- *Stock* de Tartrato de antimonio y potasio  $\text{K}(\text{SbO}) \text{C}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 1/2 \text{H}_2\text{O}$ .
- Sulfanilamida  $\text{C}_6\text{H}_8\text{N}_2\text{O}_2\text{S}$ .
- Cámara refrigeradora de 4 °C.

### *Análisis*

- Auto-analizador modelo Skalar.
- PC con Flow Access® Software.
- Repuestos bombas y circuitos Skalar (tubos tygon y silicona, enganches).
- Lubricante tubos (bombas).
- 11 tubos para los estándar + tracer.
- Garrafas contenedoras de residuos.
- Kit columnas Cd-Cu (jeringas, tubo, embudo, pinzas, Cadmio activado).

### *Muestreo y conservación de las muestras*

- Se llenarán botellas de 1 l que servirán tanto para el análisis de nutrientes inorgánicos, como de orgánicos.



- De las botellas de 1 l de muestreo se llenarán tres tubos (uno para el análisis del nitrato-silicato, otro para el análisis del nitrato-fosfato y otro de respeto que permanecerá congelado a -20 °C) que habrán sido previamente etiquetados con la siguiente información y usando cinta y rotulador permanente:

Malaspina      Fecha: \*\*/\*\*/\*\*

Estación:

Botella:                      Profundidad (m):

- Los tubos se lavarán tres veces antes con el agua de muestra. Se utilizarán guantes y se evitará tocar el tubo y el tapón por su interior. Se cogerán tres réplicas por profundidad. Las tres réplicas se congelarán en una gradilla a -20 °C. Dos de las réplicas se guardará en la caja de “Muestras diarias” ya que se analizarán a bordo al día siguiente. La otra réplica se guardará en la caja “Muestras congeladas” para su posterior análisis en laboratorio en tierra.
- Para comprobar si se ha roto el proceso de congelación se congelarán en modo vertical pero las de respeto, una vez congeladas se guardarán tumbadas juntas por leg en una bolsa adecuadamente etiquetada.

### *Preparación de reactivos*

Se realizarán siempre bajo campana, con guantes de nitrilo y en el caso del manejo de ácidos fuertes concentrados, con gafas protectoras.

### **Reactivos Nitrato**

*Reactivo de Cloruro de amonio:* se disuelven 10 g de cloruro de amonio en 1000 ml de agua MQ y se ajusta el pH a 8.5 con una solución de amonio al 25%. Se añade 1 ml de Brij-35 y se mezcla. Ha de prepararse cada semana.

*Reactivo color:* se disuelven 10 g de Sulfanilamida y 0.5 g de Dihidrocloreto de N-1 Naftiletileno de diamina (NED). Se le añade 100 ml de ácido ortofosfórico y se mezcla. Diluir hasta 1000 ml. Es estable un mes. El reactivo no debe presentar color. Si aparece rosado es probable que el ácido ortofosfórico esté contaminado.

### **Reactivos Nitrito**

*Reactivo color:* se disuelven 5 g de Sulfanilamida y 0.25 g de Dihidrocloreto de N-1 Naftiletileno de diamina (NED). Se le añade 50 ml de ácido ortofosfórico y 2 ml de Brij-35. Diluir hasta 500 ml. Es estable un mes.

### Reactivos Fosfato:

*Ácido Ascórbico:* se disuelven 2 g de ácido ascórbico y 2 g de dodecil sulfato (SDS) en 200 ml de agua MQ. Se le añade 11.25 ml de acetona y se diluye hasta 250 ml. Ha de prepararse cada semana.

*Molibdato de amonio:* se disuelven en 400 ml de agua MQ, 3 g de molibdato de amonio y 11 ml de *stock* tartrato de potasio de antimonio (2.3 g de tartrato de potasio de antimonio en 100 ml de agua MQ). Se le añade 32 ml de ácido sulfúrico y la mezcla se diluye hasta 500 ml. Su caducidad es mensual.

### Reactivos Silicato

*Ácido Ascórbico:* se disuelven 12.5 g de ácido ascórbico en 250 ml. Ha de prepararse cada semana.

*Molibdato de amonio:* se disuelven en 400 ml de agua MQ, 7.5 g de molibdato de amonio y 2.5 g de SDS. Se le añade 2.1 ml de ácido sulfúrico y la mezcla se diluye hasta 500 ml. Su caducidad es semanal.

Los reactivos habrán de guardarse en la cámara de refrigeración de 4 °C.

### Preparación de patrones para las rectas de calibración

- Preparación de los estándar secundarios 100  $\mu\text{M}$  a partir de los estándar primarios 10000  $\mu\text{M}$  de cada nutriente. Los nutrientes se analizarán en combinado. Por esto para el nitrato-silicato cogeremos 10 mL del primario correspondiente a cada uno y prepararemos el estándar secundario 100  $\mu\text{M}$  en una botella de 1000 ml. De igual manera para el fosfato-nitrato pero cogeremos 5 ml ya que prepararemos una botella de 500 ml. El estándar primario es estable por tres meses. El segundo de 100  $\mu\text{M}$  por un mes.
- En cada análisis diario de muestras se ha de realizar una recta de calibración de cinco puntos. Además se preparará dos matraces extra, uno de nitrato-fosfato y otro de nitrato-silicato, para valorar el rendimiento de la columna de cadmio. Los calibrantes se prepararán en matraces de 100 ml con agua de mar artificial a partir del estándar secundario de 100  $\mu\text{M}$  correspondiente. No se usarán los tapones por ser foco de contaminación. Se taparán con parafilm y se agitarán 33 veces para asegurarnos una buena mezcla. Cuando no se usen habrán de estar siempre refrigerados en la cámara de 4 °C. Las concentraciones serán las siguientes:

SILICATO (ml)	NITRATO (ml)	NITRITO (ml)	FOSFATO (ml)
0.5	0.5	0.05	0.05
1.0	1.0	0.1	0.1
5.0	5.0	0.3	0.3
15	15	1.0	1.0
45	30	2.5	2.5

Volumen (ml) a tomar de las disoluciones de 100  $\mu\text{M}$  patrones secundarios y a diluir en 100 ml. Caducidad: una semana.

### Preparación de agua de mar artificial

El agua de mar artificial nos va a servir tanto para el análisis con el Skalar como en la preparación de los calibrantes. Disolveremos 140 g de Cloruro de Sodio en 4000 ml. No usar el mismo agua más de dos días seguidos.

### Preparación de los surfactantes (Brij-35, SDD6)

En dos matraces de 1000 ml diluyo 4 ml, uno de la solución de brij-35 para el nitrato y el nitrito y otro para el jabón SDD6 del fosfato y silicato.

### Pasos previos al análisis de las muestras

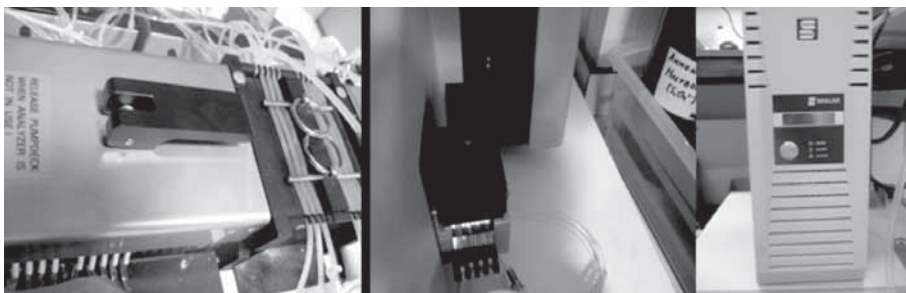
- Sería conveniente el día anterior tener en cuenta lo siguiente:
  - Que los reactivos que vamos a usar no están caducados y que tenemos suficiente cantidad para un próximo análisis.
  - Caducidad y cantidad de los estándares secundarios y de los patrones de calibrado.
  - Prever la necesidad de usar una nueva columna de Cadmio o de realizar un seguimiento de la actual en uso en el próximo análisis.
  - Tenemos suficiente Agua de mar artificial para realizar el análisis.
  - Si habremos de realizar el lavado con HCl o lejía en el próximo análisis.

### - Previo al análisis:

- Los botes de reactivos, de patrones y la columna habrán de estar a temperatura ambiente antes de usarlos.
- Tener a disposición suficiente MQ y agua de mar artificial para el análisis.
- La aguja y las bandejas del Sampler están bien ajustadas.
- Los tubitos de estándar o calibrantes, en el caso de ser de nuevo uso están limpios y secos.
- Las muestras a analizar estarán ya descongeladas o al menos que podamos prever que cuando comencemos su análisis lo estarán.
- Tanto el bidón de recogida de agua como de residuos están vacíos.
- Todos los botes están bien ajustados para evitar que se derramen con el movimiento del barco.
- Que vamos a disponer del tiempo suficiente para hacer un seguimiento cuasi-continuo del progreso del análisis.

### - Puesta en marcha del Skalar:

- Todas las líneas (de muestra y reactivos) estarán en agua MQ.
- Cerrar las bombas.
- Encender el ordenador y cargar el sistema.
- Encender la Interface.

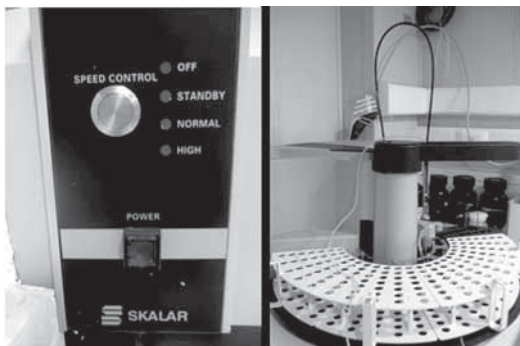


Bombas circuitos

Bomba Sampler

Interface

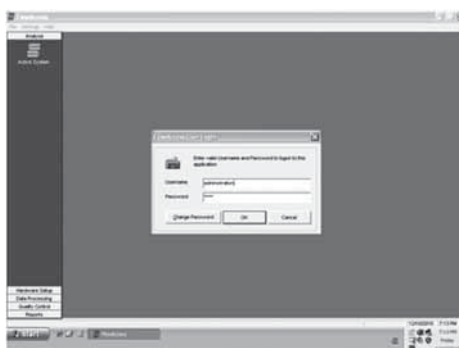
- Encender el Sampler y dejarlo estabilizar (unos 10 min). Una buena referencia es cuando la cubetita de la aguja ya está llena de agua. La luz roja está fija. Solo se pone en intermitencia cuando está ya analizando muestras.
- Encender el analizador. Botón verde. Entonces las bombas comenzarán a funcionar. Solemos dejarlo en velocidad normal.



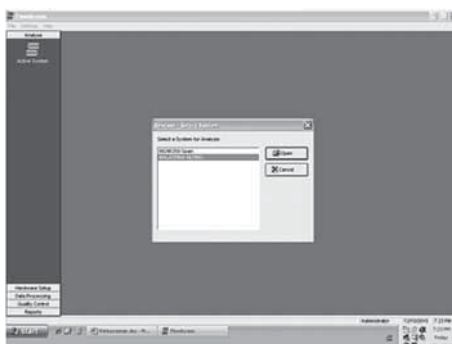
Analizador

Sampler

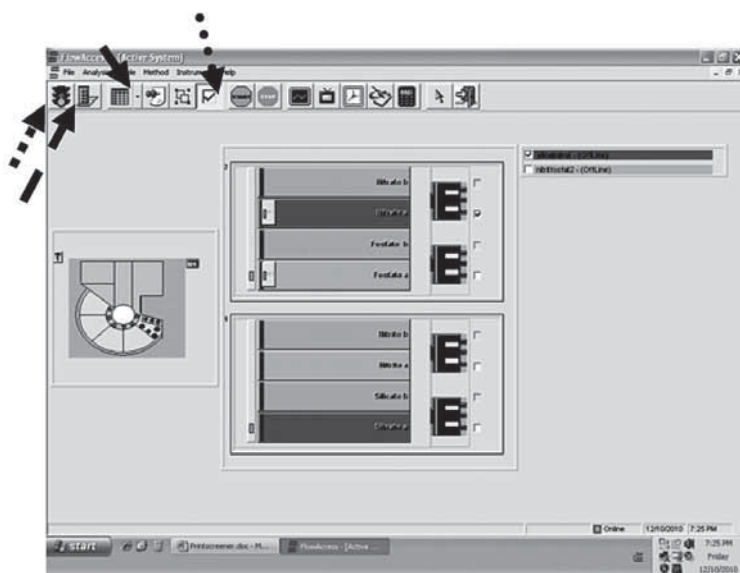
- Dejaremos que el sistema se **estabilice** durante 35 minutos (FASE DE LAVADO /ACONDICIONADO). Durante este proceso se realizarán los siguientes pasos:
  - Abrir el programa Flow Access. User: administrator // password: admin.



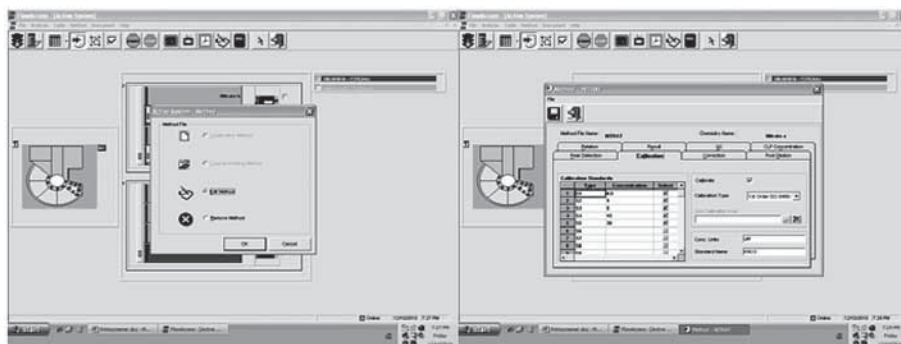
- Abrir el Active System y seleccionamos: MALASPINA NUTINO.



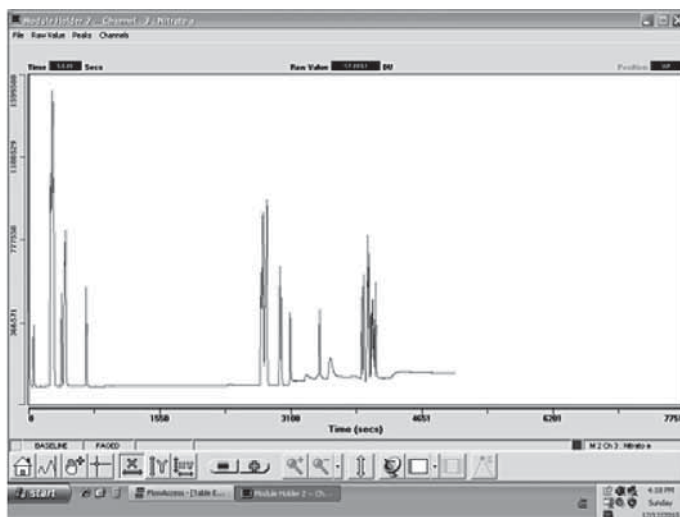
- Mirar si los baños están a 40 °C.
- En la pantalla de Active System:
  - Flecha negra: indica el botón con el que marcas los canales.
  - Flecha puntos: indica la opción con la que abres la Real Time Window.
  - Flecha cuadros: indica la opción de editar la tabla.
  - Flecha punteada: indica la opción de editar los métodos.



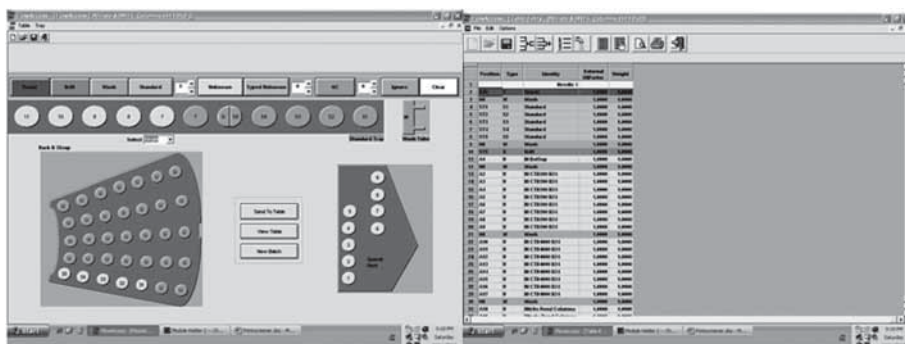
- Seleccionar los canales que vas a usar para tu análisis.
- Comprobar que los métodos están correctos. Solo se harán modificaciones si fuera el caso en la opción de Calibración.



- Abrir la Real Time Window para comprobar la línea base. En esta fase podremos descubrir posibles fuentes de error y subsanarlas, como entradas de aire por ajustes flojos, tubos desgastados o contaminación de reactivos.



- Colocación de la columna de Cadmio. Durante la fase de acondicionado 2.
- Preparación de la tabla y el workload (las imágenes son solo ejemplos aleatorios).



- Colocación de las muestras y los estándares en el Sampler.
- Una vez nos hayamos cerciorado de que todo está correcto y hayamos obtenido una línea base estable cerramos la Real Time Screen y podemos comenzar con análisis (opción Start).

- Lavado y acondicionado del Skalar previo al análisis:

Al inicio de cada leg con lejía (1:10)

Lavado inicial	Lavado 1	Tiempo (minutos)	Lavado 2	Tiempo (minutos)	Lavado 3	Tiempo (minutos)	Lavado 4	Tiempo (minutos)
Líneas muestra	MQ	1	Lejía 1:10	10	MQ	5	MQ	15
Líneas Reactivos	MQ	1	Lejía 1:10	10	MQ	5	Jabón	15
Línea Sampler	MQ	1	Lejía 1:10	10	MQ	5	MQ	15

\* Después continuaríamos como en el punto 3 – Acondicionado 1.

Al inicio de cada semana (o cada siete días):

Lavado inicial	Lavado 1	Tiempo (minutos)	Lavado 2	Tiempo (minutos)	Lavado 3	Tiempo (minutos)	Lavado 4	Tiempo (minutos)
Líneas muestra	MQ	1	HCL 5%	10	MQ	5	MQ	15
Líneas Reactivos	MQ	1	HCL 5%	10	MQ	5	Jabón	15
Línea Sampler	MQ	1	HCL 5%	10	MQ	5	MQ	15

\*Después continuaríamos como en el punto 3 – Acondicionado 1.

Al inicio de cada análisis (diario)-aproximadamente 30-35 minutos:

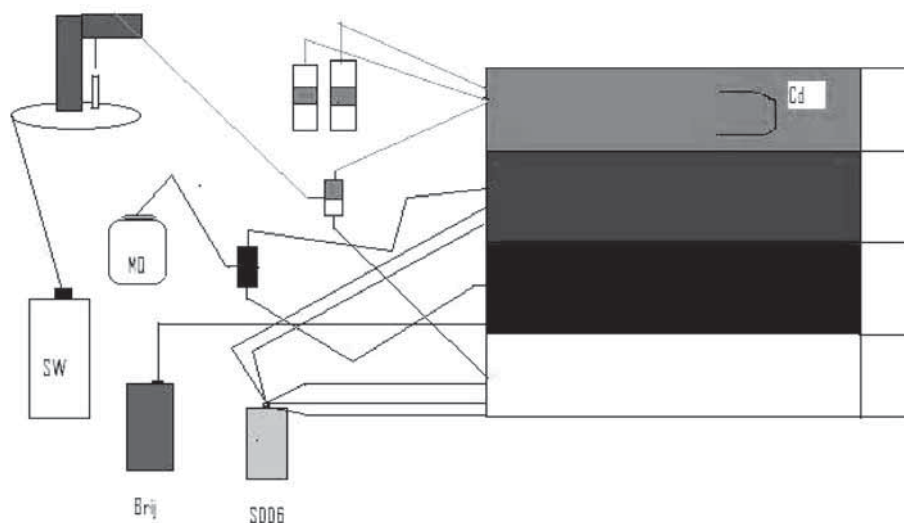
Lavado/Acond. Inicial	Lavado 1	Tiempo (minutos)	Lavado 2	Tiempo (minutos)	*Acond. 1	Tiempo (minutos)	*Acond. 2	Tiempo (minutos)
Líneas Sampler (Uso)	MQ	5	MQ	15	SW	5	SW	10
Líneas Muestra (Espera)	MQ	5	MQ	15	MQ	5	MQ	10
Líneas Reactivas (Uso)	MQ	5	Jabón	15	Jabón	5	Reactivos	10
Líneas Reactivas (Uso)	MQ	5	Jabón	15	Jabón	5	Jabón	10



## Análisis de las muestras:

### *Rendimiento de la columna reductora*

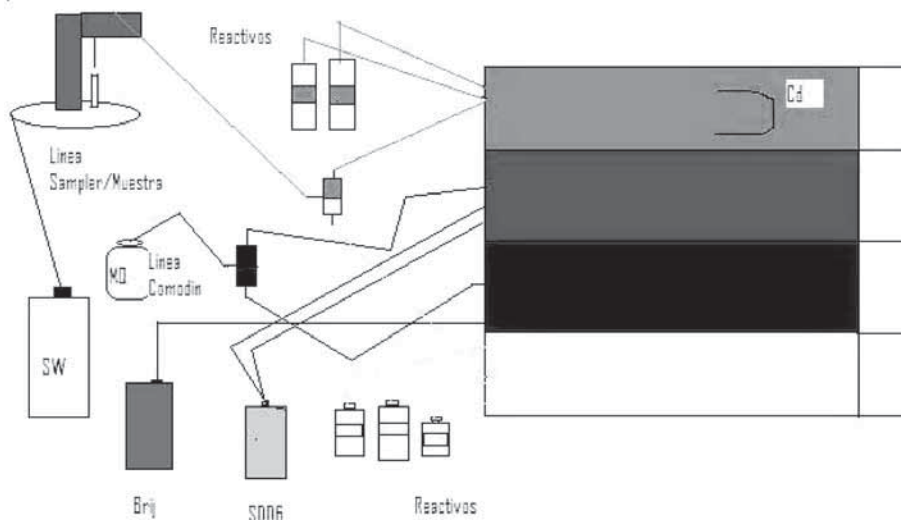
- Cada vez que usemos una columna nueva habremos de calcular su rendimiento.
- Seleccionamos el canal del nitrato.
- Las líneas y la columna deberán estar colocadas de acuerdo al siguiente esquema. La colocación de la columna requiere guantes por su toxicidad, y se habrá de instalar y desinstalar de forma que nunca le entre aire porque se estropea.



- Seleccionamos la tabla correspondiente y ponemos en la bandeja del Sampler dos tubos con el patrón de prueba de columnas de nitrato-fosfato, y de nitrato-silicato. Los tubos se han de acondicionar antes.
- Una vez nos hayamos asegurado de que todo está correcto, cerramos la Real Time Window y pulsamos el icono de Start dando comienzo el análisis.
- Si abrimos de nuevo la Real Time Window podremos seguir su desarrollo de nuevo. Tras la línea base obtendremos dos picos de concentración de nitrato. Uno del nitrato y otro el del nitrato que al pasar por la columna se reduce a nitrato. Las dos cantidades deberían ser iguales. La diferencia nos da la eficiencia o rendimiento de la columna. En esta campaña vamos a aceptar una columna válida si el rendimiento está entre un 87 – 100%.
- Una vez finalice, el sistema avisa con dos fuertes pitidos y se detiene.

### *Análisis del nitrato-silicato y seguimiento del rendimiento de columna*

- Las líneas estarán dispuestas como en el esquema.



- Elegimos el canal del nitrato y del silicato.
- Tendremos que cambiar a la **tabla correspondiente** y por tanto el **workload**. Deben estar incluidos los **5 estándar de nitrato-silicato** más el **tracer** para hacer la recta de calibrado. A su vez tendremos que añadir las muestras a la **tabla** y actualizar el **workload**.
- Es importante separar con un “wash” diferentes series de muestras para luego identificarlas adecuadamente (por ejemplo, botellón de superficie – wash – CTD 200 – Wash – tubo nitrito (prueba columna) – tubo nitrato (prueba de columna) – Wash CTD 4000 – muestras N15).
- Una vez nos hayamos asegurado de que todo está correcto, cerramos la Real Time Window y pulsamos el icono de Start dando comienzo el análisis.
- De igual forma, cuando finalice, el sistema se detendrá y avisará con dos pitidos fuertes. En este momento podremos realizar el cambio al análisis del siguiente nutriente.

### *Cambio de combinado de nutrientes*

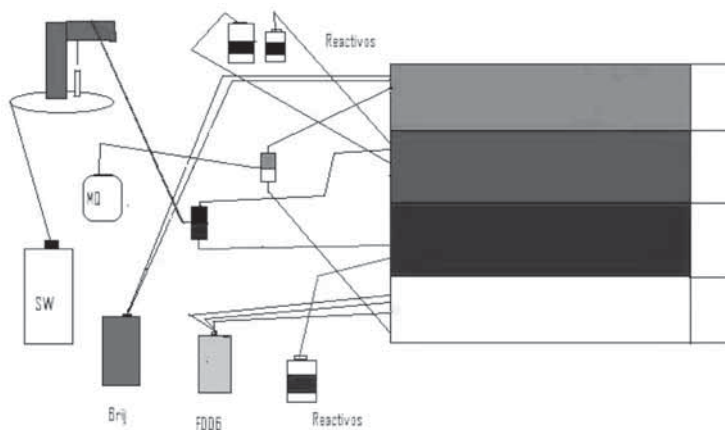
- Quitamos la columna de Cadmio. Tener cuidado de quitar siempre primero el extremo por el que nos aseguramos que no entra aire. Después se le vuelve a inyectar Cloruro de Amonio, se sumergirá en

su bote con Cloruro de Amonio y se guardará en la nevera. En lugar de la columna se pondrá el tubo que cierra el circuito de nitrato.

- Para poner/quitar la columna es mejor no poner el sistema en Stand by para ver bien a través del sentido del fluido de muestra, cuál es el sentido correcto de poner/quitar la columna.
- Ahora podemos poner el sistema en Stand by para hacer el cambio de líneas. Primero las líneas de reactivos que acabamos de usar se sacan de los botes de reactivos y se ponen en su jabón.
- Las líneas de reactivos que vayamos a usar se sacan de sus jabones y se ponen en sus botes de reactivos.
- Se cambia la línea de sampler/muestra al otro enganche y la línea de muestra (comodín) que ya no se va a usar se pone en MQ.
- Dejemos un minuto o dos que el nuevo circuito se condicione.
- Procederíamos al análisis del Nitrito-Fosfato.

### *Análisis del Nitrito-fosfato*

- Ponemos el analizador en Stand by y procedemos al cambio de reactivos y de líneas de muestra como se indica en el esquema.
- Seleccionamos el canal del nitrito-fosfato.



- Comprobamos de nuevo la tabla y el workload realizando las modificaciones que fuesen necesarias.
- Cambiamos los patrones. Añadimos los de nitrito-fosfato.
- Una vez está todo perfecto, ponemos el analizador en modo normal y pulsamos start para comenzar de nuevo el análisis.
- De igual forma, cuando finalice, el sistema se detendrá y avisará con dos pitidos fuertes. En este momento podremos dar por acabado el análisis de nutrientes y pasaremos a la siguiente fase.

## Paso final al análisis de muestras:

### *Lavado final post-análisis (fundamental)*

Lavado inicial	Lavado 1	Tiempo (minutos)
Líneas muestra	MQ	30
Líneas Reactivos	Jabón	30
Línea Sampler	MQ	30

## Procesado de datos

Al finalizar en la opción results podremos chequear los resultados del análisis. Además se exportará a .xls y se hará una copia de seguridad diaria tanto de los .xls, como de los. run que genera el Flow Access.

## Parado del Skalar

- Apagar el Analizador.
- Cerrar el Flow Access.
- Apagar el Sampler.
- Apagar la Interface.
- Apagar el ordenador.
- Abrir las bombas.

Antes de dar por acabado el análisis se harán aún una serie de pasos:

- Se dejan todas las líneas en MQ.
- Se vacían los contenedores de residuos.
- Se desechan los tubos de muestras.
- Si ha sobrado estándar en los tubos de calibración del Skalar se tapan con parafilm y se guardan, junto con los reactivos y los patrones en la cámara de 4 °C.

## Recomendaciones

Cada mes, o al inicio de cada leg, es recomendable cambiar los tubos de las bombas.

## Referencias

- Phosphate in Water and Seawater: AutoAnalyzer Applications, Method-No. G-175-96 Rev 13 (multitest MT 18), Seal Analytical.
- Nitrite in Water and Seawater: AutoAnalyzer Applications, Method-No. G-173-96 Rev 9 (multitest MT 18), Seal Analytical.
- Nitrate and Nitrite in Water and Seawater: AutoAnalyzer Applications, Method-No. G-172-96 Rev 15 (multitest MT 19), Seal Analytical.
- Silicate in Water and Seawater: AutoAnalyzer Applications, Method-No. G-177-96 Rev 10 (multitest MT 19), Seal Analytical.
- GRASSHOFF, K., K. KREMLING, M. EHRHARDT (eds). 1999. *Methods of Seawater Analysis*; Wiley-VCH, Third edition.



# Análisis de amonio en aguas marinas y aguas dulces por fluorimetría

Horstkotte, B.; Duarte, C. M.

*Instituto Mediterráneo de Estudios Avanzados (UIB-CSIC)*

## Finalidad. Campo de aplicación

La presente metodología está diseñada para obtener y analizar muestras de amonio disuelto en agua de mar y aguas dulces para concentraciones de 0-10  $\mu\text{mol/L}$ . Por extrapolación de la curva de calibración, una estimación hasta 20  $\mu\text{mol/L}$  es posible.

## Conceptos generales

Amonio es generado por biodegradación de materia orgánica y presenta uno de los importantes “pools” de nitrógeno en aguas marinas. La concentración del amonio en aguas marinas es de interés para modelar el intercambio de gases tal como el amonio en la interfase atmósfera-agua y obtener información sobre la actividad metabólica en la masa del agua.

La determinación de amonio por espectrofotometría por el método de Berthelot basado en la reacción del amonio con el hipoclorito y fenol para formar el indofenol azul-verde se ha sustituido por un método más sensible y menos afectado por la salinidad de la muestra o precipitación de hidróxidos de metales tierra-alcalinos. El método consiste en la cuantificación del amonio que reacciona con el orto-ftaldehído (OPA) y luego su reducción con sulfito de sodio, este compuesto luego se detecta con fluorimetría. El producto es el isoindol-1-sulfonato que demuestra una fluorescencia intensa en 425 nm usando una longitud de

onda de la excitación de 365 nm. En los últimos años, este método está aceptado y es de uso general como metodología para la determinación de amonio en aguas marinas. Una comparación detallada sobre diferentes métodos de análisis del amonio se da en Molins-Legua et ál. (2006) citando también las diferentes aplicaciones del método analítico presentado a continuación.

### Equipamiento necesario y modo de operación y medición

Se requiere un espectrofluorímetro y un baño de agua ajustado a 37 °C.

En el *BIO Hespérides* se trabaja actualmente con el espectrofluorímetro LM55 de Perkin Elmer. Los parámetros adecuados se detallan en el siguiente parágrafo.

Se enciende el fluorímetro al menos media hora antes para que la bombilla se estabilice. Asegurarse de que la lámpara está encendida y que funciona la comunicación con el PC de control. El método a seleccionar es "Malaspina nh3.mth" que selecciona los siguientes parámetros en el instrumento:

Excitation wavelength:	365 nm
Slit width (apertura de diafragma):	5 nm
Emission wavelength:	425 nm
Slit width (apertura de diafragma):	5 nm
1% filtro de attenuator	Active
Tiempo de integración:	3 s

Orden de medición para Perkin Elmer:

1. Se mete una cubeta con agua de mar / agua Milli-Q que se ha usado para el patrón en el soporte.
2. Se mide el *background* ("Measure BG") 3 veces y se calcula el promedio.
3. Se introduce el promedio en el campo correspondiente y se marca "Substract BG".
4. Para cambiar la muestra, se lava la cubeta a menos dos veces con un poco de la muestra nueva.
5. Se espera que la señal se estabilice y se lee tres valores para compensar variaciones por turbidez etc. que no deberían ser mayor que aproximadamente 2%.
6. Se comienza la medición continua chequear al símbolo de semáforo (cambia de verde a rojo).
7. Para terminar o modificar parámetros se desactiva la medición (cambia de rojo a verde).



Para el instrumento RF5301PC de recambio de Shimadzu se aplica los siguientes parámetros:

Modo de adquisición:	Quantitative, Raw Data measurement
Excitación de longitud de onda:	365 nm
Slit width (apertura de diafragma):	5 nm
Emisión de longitud de onda:	425 nm
Slit width (apertura de diafragma):	5 nm
Sensibilidad:	LOW
Shutter: diafragma:	Open
Rango:	0 to 100 (Intensity)

Orden de medición para Shimadzu:

1. Se mete una cubeta con agua de mar / agua Milli-Q que se ha usado para el patrón en el soporte y hacer un AutoZero.
2. Para cambiar la muestra, se lava la cubeta a menos dos veces con un poco de la muestra nueva.
3. Se espera que la señal se estabilice y se lee tres valores para compensar variaciones por turbidez etc. que no deberían variar más que aproximadamente 2%. Se puede usar la tecla de función F7 para hacer una medida que resulta mucho más fácil que usar el ratón.
4. Anotar tres lecturas para compensar variaciones por turbidez etc. Debe ser menor que 2% del valor medido.

## Reactivos u otro material fungible

### *Reactivos*

Si no está indicado, se prepara los reactivos con agua de calidad Milli-Q:

1. Sulfito de sodio (8 g/l, cantidad recomendado: 2 g para 250 ml de reactivo).
2. Disodio tetraborato decahidratado (30 g/L, cantidad recomendado: 60 g para 2 l de reactivo).
3. Orto-ftaldehído (OPA, P-1378 Sigma-Aldrich). (2 g por 50 ml de etanol)  
Medidas de seguridad: R36/37/38 (Irrita los ojos, la piel y el sistema respiratorio); S26/28/36 (En caso de contacto con los ojos lavar con mucha agua dulce y buscar ayuda médica; en caso de contacto con la piel, igual; llevar sistemas de seguridad adecuados).
4. 50 ml de etanol (Carlo Erba 414607).
5. Cloruro de amonio (0.5351 g/l exacto, peso molecular: 53.49 g/mol).
6. Ácido clorhídico diluido a 1% para lavar los tubos de incubación.

### *Material*

1. Filtros Whatman GF/C o GF/F 47 mm.
2. Matraces 100, 250 y 1000 ml.
3. 1x Botella de vidrio ámbar 250 ml (sulfito).
4. 2x Botella de vidrio ámbar 2.5 l (Borato).
5. 1x Botella de vidrio 100 ml (OPA).
6. 2x Botella de vidrio ámbar de 1 l (soluciones madres de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  en agua de mar y en Milli-Q).
7. Agitador magnético e imanes.
8. Cronómetro.
9. Baño María (37 °C).
10. Soporte de filtración enroscable en un botella de vidrio.
11. Cubetas para espectrofluorimetría, 1 cm, de plástico (para una mejor reproducibilidad se recomienda cubetas de Special Optical Glass).
12. Tubos polipropileno de 15 ml.
13. 2-3 x Gradillas.
14. Pipeta automática 1 a 10 ml + puntas.
15. Pipeta automática de 100 a 1000  $\mu\text{L}$  + puntas.
16. Pipeta 10 ml.

### *Preparación de reactivos y patrones*

Todo el material (excepto los tubos nuevos) se lava con ácido clorídico (3.5 – 4%) y agua de calidad Milli-Q. En el caso de reutilización de los tubos, lavarlos y dejar secar completamente.

#### **1. Solución reductora de sulfito**

- Sulfito de sodio de 8 g/l de agua de calidad Milli-Q.
- Conservación a temperatura ambiente en una botella de vidrio bien cerrado durante un mes.
- Se recomienda usar una botella tan pequeña como sea posible para evitar el contacto con un gran volumen de aire.

#### **2. Tampón**

- 30 g/l de disodio tetraborato decahidratado en agua de calidad Milli-Q.
- Se disuelve lentamente, usar un baño de ultrasonidos o dejar disolver durante la noche.
- Se filtra la solución mediante un filtro Whatman GF/C o GF/F.

- Permanece estable durante meses en una botella ámbar pirex.
- No se guarda en frío porque puede causar precipitación del tetraborato.

### 3. Solución de OPA

- Se disuelve 2 g de OPA (P-1378 Sigma Aldrich)) en 50 ml de etanol (Carlo Erba 414607).
- Se conserva durante dos meses en una botella de vidrio en un refrigerador y en oscuridad (tapar la botella con papel de aluminio).
- OPA es una sustancia tóxica y se debe usar guantes de nitrilo sin polvo.
- No usar guantes de látex ya que pueden contener restos de amonio por su fabricación.

### 4. *Working reagent* (WR)

- Se añade en una botella de borosilicato en el siguiente orden y mezclando cada vez los reactivos: 500 ml del tampón de borato, 10 ml de la solución de OPA y 2 ml de la solución de sulfito de sodio.
- El *working reagent* ha de ser preparado 24 h antes de ser utilizado.
- Se conserva a temperatura ambiente (precipitación del borato a temperaturas más bajas) y protegido de la luz.
- Se recomienda preparar el *working reagent* cada semana para evitar la oxidación del sulfito.
- Anotar las pendientes de las calibraciones diarias para tener un control sobre la estabilidad del *working reagent*.

### 5. Soluciones madres de cloruro de amonio

- Se prepara la solución madre disolviendo 0.5351 g de cloruro de amonio en medio litro de agua Milli-Q equivalente a 20 mmol/l.
- Se diluye a 10  $\mu\text{mol/l}$  (e.g. 500  $\mu\text{l}$  a 1 l) obteniendo el patrón más concentrado con el que se preparan los demás patrones.
- Se usa para la dilución agua de mar estándar o agua de mar profunda de bajo contenido de nutrientes para las mediciones de aguas marinas y se usa agua Milli-Q para la medición de aguas dulces.
- Para la eliminación de amonio se recomienda alcalinizar el agua con sosa, burbujear con un flujo de nitrógeno que ha pasado un ácido no-volátil ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) y añadir después un equivalente a la sosa de ácido clorhídrico para llegar al pH inicial de la muestra.
- La solución de 10  $\mu\text{mol/L}$  se guarda bien cerrada en la nevera y se prepara al menos una vez por semana.
- Se recomienda usar alícuotas congeladas de la solución madre del cloruro de amonio 20 mmol/L para preparar la solución estándar de 10  $\mu\text{mol/L}$  para mejorar la reproducibilidad de las calibraciones.

### *Preparación de patrones y calibración*

Antes de su uso se deja equilibrar las soluciones a temperatura ambiente. Se preparan los siguientes patrones para una recta de calibración lineal.

Se debe pipetear de la concentración más baja a la más alta. Para la solución madre no hace falta cambiar la punta de pipeta. En caso contrario hay que cambiarla cada vez o limpiarla con Milli-Q y enjuagarla con la nueva muestra.

Concentración [μmol/l]	Volumen de patrón [ml] *	Volumen de agua para enrasar a 10 ml [ml]
0.00	0.00	10.0
0.25	0.25	9.75
0.50	0.50	9.50
0.75	0.75	9.25
1.00	1.00	9.00
2.50	2.50	7.50
5.00	5.00	5.00
7.50	7.50	2.50
10.0	10.0	0.00

\* Se necesita aproximadamente 50 ml de estándar por cada calibración

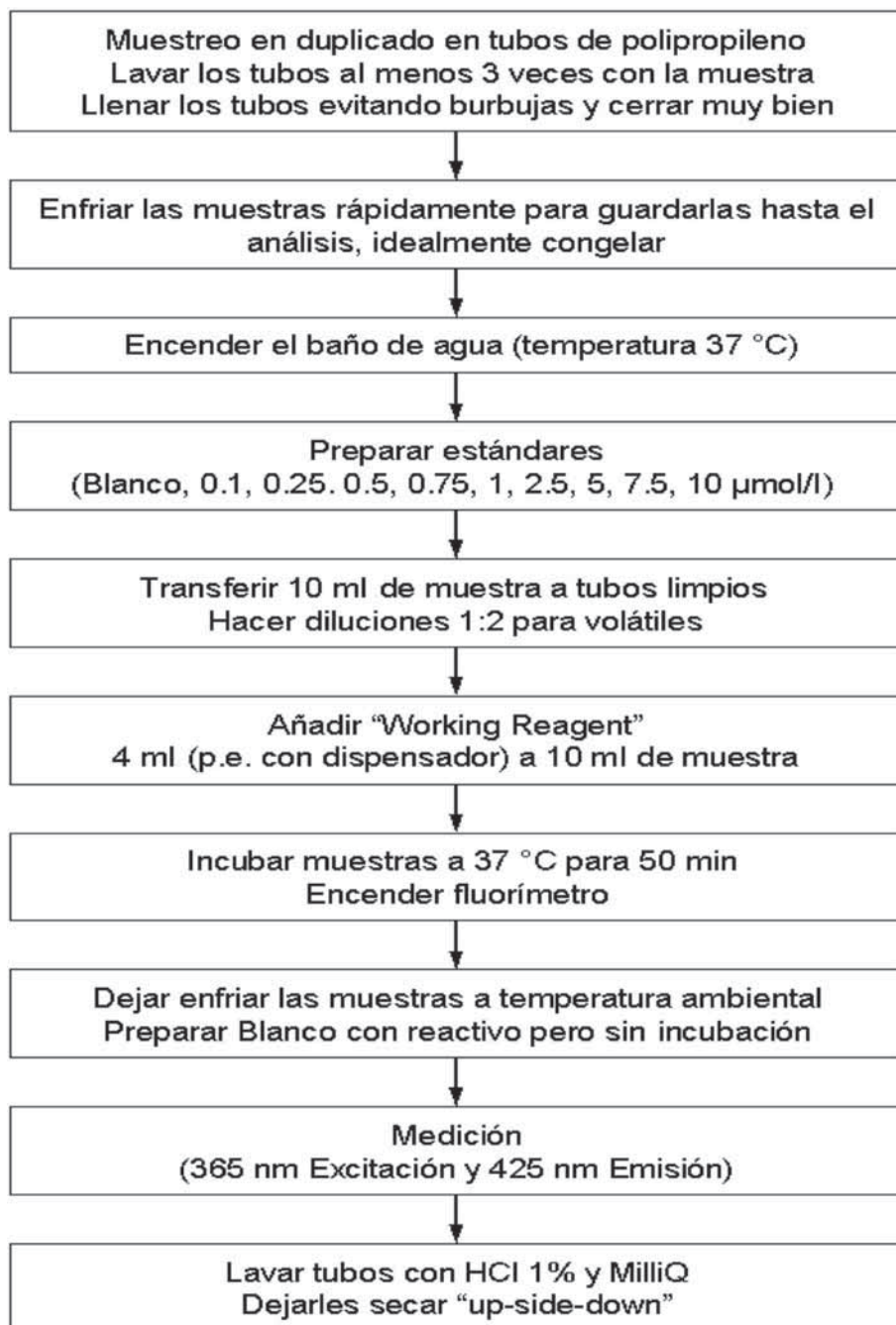
Además se mide una solución de agua Milli-Q o agua profundo sin incubación para evaluar el blanco del reactivo por la dificultad de conseguir aguas SIN amonio (contaminación en el laboratorio, etc.).

### **Descripción de la técnica (muestreo y tratamiento)**

- Se etiqueta adecuadamente los tubos de polipropileno con un rotulador indeleble
- En el caso de muestreo de botellas Niskin se abre el pitorro arriba, después abajo. No hace falta muestrear con tubos de silicona pero hay de evitar la formación e introducción de burbujas en el tubo durante el muestro.

- Se enjuagan los tubos de polipropileno a menos dos veces con la muestra y se llena los tubos completamente. Después se cierra los tubos con fuerza.
- En el caso que no se puedan medir las muestras inmediatamente, se guarda las muestras por debajo de 4 °C sin congelarlas. Las muestras de aguas templadas o cálidas se enfrían rápidamente, por ejemplo poniendo la gradilla con los tubos en un baño de agua destilada y frío sin sumergir las tapas y una vez enfriado se guarda en una nevera.
- No usar cloruro de mercurio para guardar los muestras porque puede afectar a la reacción y por lo cual al resultado de la medición.
- Se coge 10 ml de cada muestra con una pipeta de 10 ml, se vacía el tubo completamente (sacudiendo el tubo hasta quitar todo o golpeando el tubo volcado en un papel de filtro) y se dispensan los 10 ml de nuevo en el mismo tubo.
- En el caso de reutilización de los tubos de muestreo, se recomienda transferir la muestra a tubos reservados para la reacción que se lavan después al final de cada día con ácido clorhídrico para eliminar restos del producto de la reacción y agua Milli-Q, dejando secarlos durante la noche. (Mire: "Control de calidad y recomendaciones").
- Añadir 4 ml del *working reagent* a cada 10 ml de patrón o muestra. Para esto se recomienda usar un dispensador en la botella del *working reagent* ajustado a 4 ml. En tal caso hay de desechar unos 3-4 volúmenes del reactivo al principio y antes de usarlo.
- Después de añadir el *working reagent*, cerrar bien los tubos, agitar bien, e incubar en un gradilla en un baño a 37 °C en oscuridad durante 50 minutos.
- Se saca la gradilla deja enfriar los tubos a temperatura ambiente del laboratorio.
- Se miden los patrones y muestras en el espectrofluorímetro desde la menor a la mayor concentración. Se lava la cubeta al menos dos veces con la solución y se seca por fuera antes de tomar tres medidas. Después del estándar más alto se lava una vez con Milli-Q.
- Se usa la misma cubeta para todas medidas y se debería colocar en el espectrofotómetro siempre en la misma posición. Si se usan cubetas de plástico, se puede hacer una pequeña marca con un cuchillo en el borde de la cubeta. No se usa un rotulador porque puede borrarse y la tinta puede entrar en la cubeta y cambiar la señal.

## Cuadro sinóptico de la técnica



## Cálculo de los resultados

- Generalmente no se va a encontrar un comportamiento lineal para los estándares más altos. Por experiencia se consigue un muy buen ajuste usando una función de saturación para las calibraciones de forma:

$$Y = Y_0 + A \cdot \left(1 - e^{-\frac{X}{B}}\right)$$

- Es recomendable diluir muestras de alto contenido de amonio antes de añadir el reactivo, como puede ser el caso de incubaciones, experimentos de respiración, o la evaluación de la fugacidad de amonio. Una dilución posterior a la incubación se podría hacer con un patrón de baja y conocida concentración o el patrón blanco.
- En el caso de obtener valores negativos para muestras se usa el valor más bajo como si fuera el blanco.

## Control de calidad y recomendaciones

- El patrón blanco y la pendiente de la recta de calibración son aproximadamente un 10 % más elevados para estándares de agua Milli-Q que para agua marina.
- El blanco del reactivo (concentración 0  $\mu\text{mol/l}$ ) no debe superar la intensidad correspondiente a la diferencia de señal entre blanco y el estándar de 0.1  $\mu\text{mol/l}$ , indicando al contrario una contaminación inaceptable del reactivo.
- Se recomienda centrifugar muestras turbias a una velocidad suficiente alta para precipitar partículas o esperar que la señal se establezca antes de tomar las medidas.
- Como medida y control de calidad de datos se lleva un libro / fichero de control de los coeficientes de las curvas de las calibraciones, ganando información sobre reproducibilidad, estabilidad del reactivo, y contaminación del agua profundo.
- Todas las muestras, incluyendo el muestreo, se deberían realizar en duplicado o triplicado.
- En el caso de que se reutilicen los tubos de polipropileno, es recomendable usar tubos diferentes para muestreo y para la reacción / incubación para reducir el trabajo de lavado. Mientras un lavado con agua Milli-Q se considera suficiente para los tubos usados para el muestreo, los tubos que se usa con el reactivo se deben lavar con ácido clorhídrico eliminando de este modo el producto de la reacción adsorbido a las paredes de los tubos y posteriormente con agua Milli-Q. Es además recomendable hacer el lavado cada día si falta espacio para lavar y secar los tubos después.

## Referencias

- GRASSHOFF, K., K. KREMLING, M. EHRHARDT (eds.). 1999. *Methods of Seawater Analysis*; Wiley-VCH, Third edition.
- CLESCERI, L. S., A. E. GREENBERG, R. RHODES TRUSSELL (eds.). 1998. *Standard methods for the examination of water and wastewater*, 20th Edition.
- KÉRUEL, R., A. AMINOT. 1997. «Fluorometric determination of ammonia in sea and estuarine waters by direct segmented flow analysis». *Mar. Chem.* 57: 265-275.
- MOLINS-LEGUA, C., S. MESEGUER-LLORET, Y. MOLINER-MARTÍNEZ, P. CAMPÍNS-FALCÓ. 2006. «A guide for selecting the most appropriate method for ammonium estimation in water analysis». *TRAC* 25: 282-290.



## **Filtración en rampa con presión positiva para el análisis del carbono, nitrógeno, fósforo particulado (C/N y P) y de los isótopos estables de carbono ( $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ ) y nitrógeno ( $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ ) del material en suspensión**

Vidal, M.; Teixidor, I; Galindo, M.

*Departament d'Ecologia, Universitat de Barcelona*

### **Finalidad. Campo de aplicación**

Recogida de material en suspensión sobre filtros para la determinación del carbono, nitrógeno y fósforo particulado y de los isótopos estables de carbono ( $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ ) y nitrógeno ( $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ ). Se recogerán tres filtros de cada muestra para un análisis posterior: uno para la determinación de fósforo (P), otro para la determinación conjunta de carbono y nitrógeno (C/N) y un tercero para el análisis de la composición isotópica ( $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ ).

### **Conceptos generales**

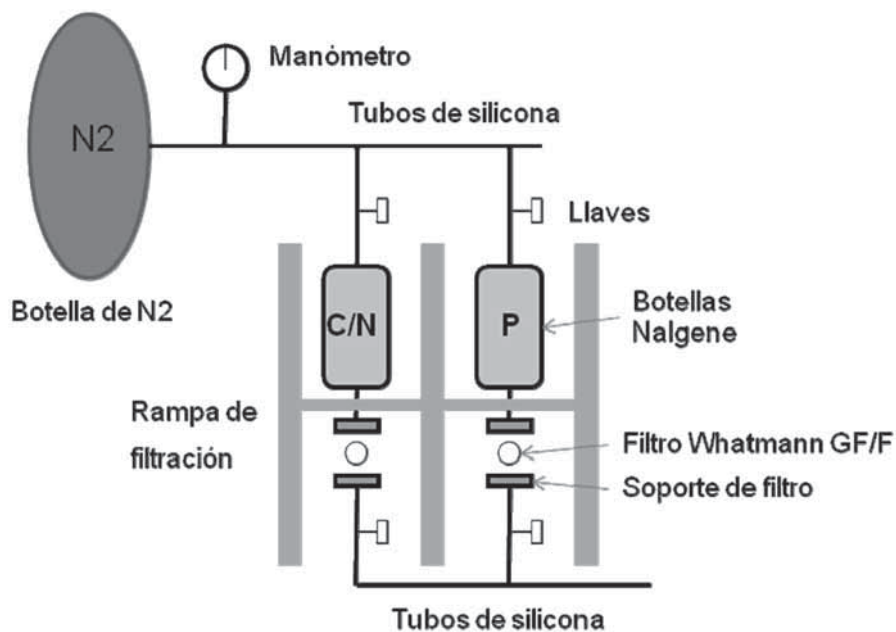
La actividad biológica lleva a la incorporación de carbono, nitrógeno y fósforo en los organismos. La concentración de carbono, nitrógeno y fósforo y la señal isotópica de carbono y nitrógeno de la fracción particulada se relaciona con las características tróficas del medio.

### **Equipamiento necesario**

Rampa de filtración conectada a botella de nitrógeno con soportes de filtros y botellas de filtración (ver foto siguiente).



Diagrama conceptual del material a utilizar



### Reactivos u otro material fungible

- Rampa de filtración.
- Botella de N<sub>2</sub>.
- Tubos de silicona .
- Manómetro.
- Llaves y conectores.
- Botellas Nalgene de filtración (de tapón de rosca y abertura inferior).
- Soportes de filtros de policarbonato de 25 mm.
- Pinzas Millipore.
- Filtros Whatman G/F F de 25 mm.
- Garrafas de 10-20 l.
- Crioviales.
- Gradillas para crioviales.
- Gradillas para muestras encapsuladas.
- Ácido clorhídrico.

### Descripción de la técnica

(0<sub>1</sub>) Usar filtros Whatmann GF/F, previamente calcinados a 450 °C durante 4 h.

(0<sub>2</sub>) Todo el material mantenido en ácido diluido y aclarado 3 veces con agua Milli-Q.

(1) Aclarar la garrafa de muestreo 1 vez con la propia muestra.

(2) Recoger todo el volumen de una Niskin a través de un tubo de silicona acabado en un prefiltro de 200 micras y que se conecta directamente a la Niskin.

(3) Montar los filtros en sus soportes.

(4) Mezclar suavemente el contenido de la garrafa (4 veces) antes de llenar las botellas de filtración, para homogenizar su contenido.

(5) Llenar las botellas de filtración con un volumen determinado de muestra.

(6) Colocar las botellas de filtración en la rampa, abrir las llaves de paso y eliminar cuidadosamente las burbujas del circuito.

(7) Verificar que la presión es inferior a 5 atm.

(8) Comprobar la estanqueidad del circuito.

(9) Proceder a la filtración (abriendo las llaves de salida del agua filtrada, recogerla en alguna botella para hacer los blancos).

(10) **Para filtrar volúmenes adicionales sobre el mismo filtro**, desenroscar el tapón con el soporte de filtro, llenar nuevamente la botella (no olvidar tapar la abertura de conexión al aire), repitiendo los pasos a partir de (4). Debe evitarse la exposición del filtro al aire.

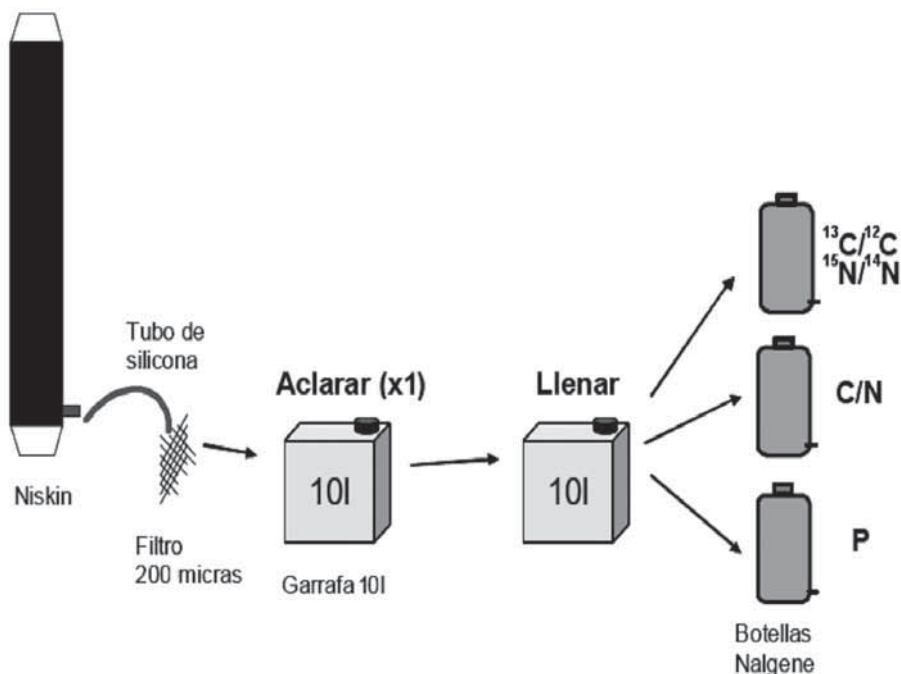
(11) Acabada la filtración, sacar los filtros de su soporte con las pinzas, depositar en un vial (previamente lavado en ácido y calcinado). Dependiendo del destino de los filtros se procederá a:

- Análisis de fósforo (P): congelar rápidamente a -20 °C.
- Análisis de carbono y nitrógeno (C/N): mantener en un desecador durante 24 h y congelar a -20 °C.
- Análisis isotópico ( $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ ): Secar en estufa a 60 °C durante 24 h y conservar a temperatura ambiente.

(12) **Preparación de blancos de filtración.** Filtrar agua previamente filtrada y recoger el filtro para su posterior análisis. Se debe filtrar un mínimo de 2 l.

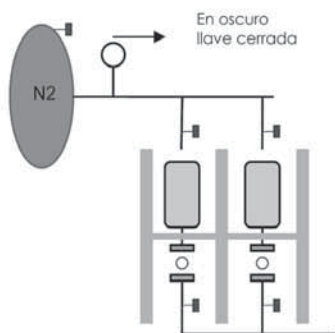
### Cuadro sinóptico de la técnica

#### *Muestreo:*

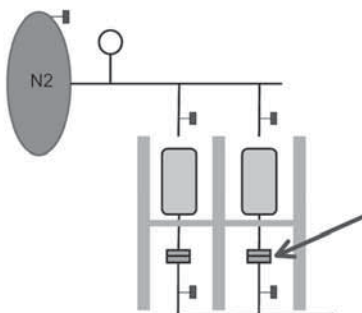


*Procesado de muestras – filtración:*

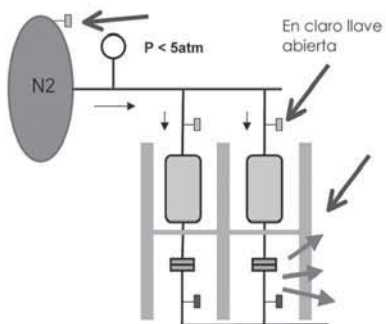
0. Inicio:



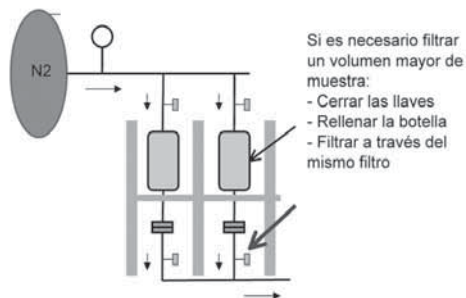
1. Montar los filtros en los soportes:



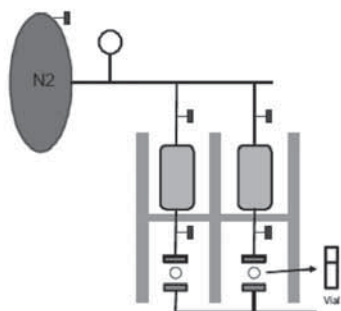
2. Abrir las llaves de paso y eliminar las burbujas:



3. Filtración:



4. Cerrar las llaves, retirar los filtros y depositarlos en un vial:





# Determinación de carbono y nitrógeno orgánico particulados mediante analizador elemental

Vidal, M.; Galindo, M.

*Departament d'Ecologia, Universitat de Barcelona*

## Finalidad. Campo de aplicación

Este método permite medir la masa de carbono y nitrógeno retenida en un filtro Whatmann GF/F, mediante combustión catalítica, seguido de una columna de reducción, de una trampa de agua, y con una lectura por cromatografía de gases en un detector de conductividad térmica.

## Conceptos generales

El carbono y el nitrógeno orgánico particulado es un producto de la actividad de los organismos. Por consiguiente tiende a acumularse en las capas superficiales de los océanos. La concentración de carbono y nitrógeno de la fracción particulada se relaciona con las características tróficas del medio.

## Equipamiento necesario

- Estufa.
- Analizador elemental (Carbo-Erba 1108).
- Flash.

## Reactivos u otro material fungible

- Ácido Clorhídrico.
- Cápsulas de estaño (Sn).

- Pentaóxido de vanadio ( $V_2O_5$ ).
- Oxígeno.
- Helio.
- Pinzas.

## Calibración

A partir de la combustión y el análisis de sustancias de referencia se obtiene el factor de proporción entre la señal eléctrica del detector de conductividad térmica y la masa del elemento, con exactitud y precisión.

## Descripción de la técnica

(1) Los filtros provenientes del muestreo de POC y PON (ver protocolo correspondiente) son desecados ( $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $>12\text{ h}$ ), expuestos a vapores de HCl concentrado (35%) durante una noche para eliminar los carbonatos de la muestra, vueltos a secar y envueltos en una cápsula de estaño (Sn) junto con pentaóxido de vanadio ( $V_2O_5$ ) que actúa como catalizador. Las muestras así preparadas se guardan en un desecador hasta el momento de su análisis.

(2) En el analizador elemental, el filtro es empujado por helio (con una presión alrededor de 120KPa en el Carbo-Erba, y de 250KPa en el Flash) al catalizador de oxidación (a  $1000\text{ }^{\circ}\text{C}$ ), donde se inyecta oxígeno (a una presión alrededor de 100KPa en el Carbo-Erba, y de 300KPa en el Flash). El estaño cataliza la combustión aumentando la temperatura a valores que pueden llegar a  $1800\text{ }^{\circ}\text{C}$ . El filtro con la muestra es incinerado de manera que se oxidan los elementos de la muestra a forma gaseosa. Posteriormente la muestra (gaseosa) pasa por la columna de cobre donde se reduce y se secuestra el estaño oxidado y después por una trampa de agua, donde se secuestra el hidrógeno oxidado.

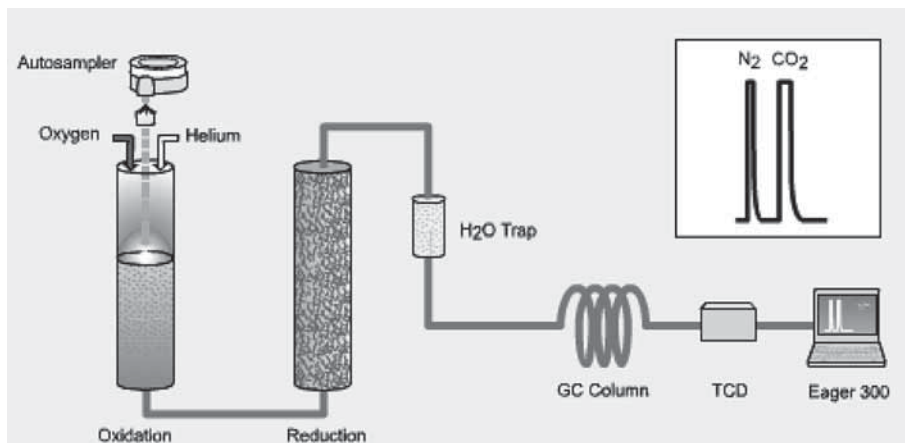
Finalmente la muestra fluye por el filamento del detector de conductividad térmica (TCD) dónde se compara con la muestra de helio puro.

(3) La cuantificación de los elementos se hace mediante cromatografía de gases. Un detector de conductividad térmica da una señal eléctrica proporcional a la cantidad del gas que fluye por el detector. Cada gas tiene su propia señal. Así podemos separar y cuantificar la cantidad de carbono y de nitrógeno que había originalmente en el filtro.

Al ser muestras de agua de mar, se halla cloruro de sodio en el filtro. El proceso debe demorarse hasta 1000 segundos por muestra, con el fin de que la señal del cloro (que también se libera en la combustión) no se solape con la señal de carbono y nitrógeno de la siguiente muestra.



## Cuadro sinóptico de la técnica



## Cálculo de los resultados

El área de la señal resultante respecto a la línea base es proporcional a la masa del elemento causante de la señal.

Con la masa obtenida en el analizador elemental y conociendo el volumen filtrado en cada filtro obtenemos la concentración de cada elemento en moles por litro. A esa concentración se le debe restar las concentraciones obtenidas en los filtros del blanco.

## Referencias

Unitat de Tècniques Separatives. Serveis Científicotècnics de la Universitat de Barcelona.

Imágenes cedidas por Thermo Scientific.



## Determinación de nitrógeno total (TN) por el método de la oxidación con persulfato en medio alcalino

Vidal, M.; Teixidor, I.; Galindo, M.

*Departament d'Ecologia, Universitat de Barcelona.*

### Finalidad. Campo de aplicación

Protocolo para la oxidación de nitrógeno orgánico. Con la aplicación del protocolo en muestras no filtradas (descritas en el protocolo de *Muestreo de nutrientes inorgánicos disueltos, nitrógeno (TN) y fósforo (TP) totales*) se obtiene la concentración total de nitrógeno (TN). El nitrógeno orgánico disuelto (DON) se obtiene a partir de la diferencia respecto al particulado en suspensión (PON) y el nitrato+nitrito; por tanto, incluye el amonio ( $\text{DON} = \text{TN} - \text{PON} - \text{nitrato-nitrito}$ ). El protocolo de muestreo de PON se describe en el capítulo correspondiente «Filtración en rampa con presión positiva para el análisis del carbono, nitrógeno, fósforo particulado» y el de análisis en otro «Determinación de carbono y nitrógeno orgánico particulados mediante analizador elemental». El análisis de nitrato y nitrito se describe en el protocolo correspondiente «Muestreo y análisis de nutrientes inorgánicos disueltos en agua de mar».

### Conceptos generales

El nitrógeno orgánico disuelto es un producto de la actividad biológica. Por consiguiente, tiende a acumularse en las capas superficiales de los océanos. La proporción de nitrógeno en forma orgánica disuelta es variable y se relaciona con las características tróficas. Las formas orgánicas disueltas pueden canalizar una parte sustancial de la exportación de nitrógeno a las aguas profundas del océano.

## Equipamiento necesario

- Autoclave.

## Reactivos u otro material fungible

- Botellas pyrex de tapón de rosca y teflón (color rojo) de 50 ml.
- Botellas de borosilicato de tapón blanco de 60 ml.
- Pipetas automáticas, 1 y 5 ml.
- Puntas de pipeta.
- Probetas de vidrio de 10, 50 y 100 ml.
- Probetas de plástico de 250 ml.
- Matraces aforados de 0.1 l, 1 l, 5 l.
- Botellas de policarbonato de 0.2 l, 0.5 l, 1 l.
- Botellas de policarbonato Nalgene de 60 ml.
- Pipeta multi-step.
- Jeringas para pipeta multi-step.
- Dosificador 10 ml.

## Reactivos

- (1) Hidróxido de sodio (NaOH).
- (2) Ácido bórico ( $\text{H}_3\text{BO}_3$ ).
- (3) Peroxodisulfato de potasio ( $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ ).
- (4) Ácido etilendiaminotetraacético disódico. EDTA disódica (372.24 g/mol).
- (5) Nitrato de potasio ( $\text{KNO}_3$ ; 101.1 g/mol).

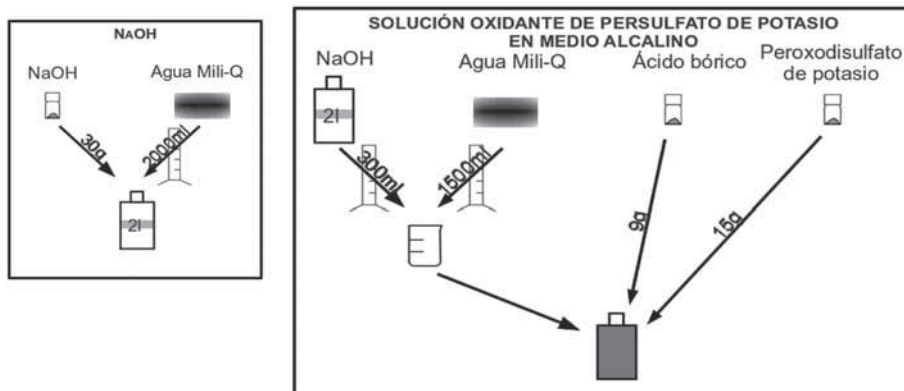
## Preparación de los reactivos

(0<sub>1</sub>) Todo el material debe lavarse en ácido diluido y aclararse 3 veces con agua Milli-Q previo a su uso.

(0<sub>2</sub>) Para evitar al máximo la posibilidad de contaminación, las botellas de análisis estarán numeradas y se usarán siguiendo el mismo orden.

(1) **Solución de NaOH 0.375 M:** disolver 30 g de NaOH en 2 l de Milli-Q. Guardar en botella de polietileno.

(2) **Solución oxidante de persulfato de potasio en medio alcalino:** Diluir 300 ml de la solución de NaOH (0.375 M) a 1.5 l de agua Milli-Q dentro de una botella de polietileno de 2 l. Disolver 15 g de persulfato de potasio y 9 g de ácido bórico. Guardar refrigerada y protegida de la luz. La solución es estable durante algunas semanas.



## Calibración

(1) Se utiliza la misma serie patrón, a partir de nitrato de potasio ( $\text{KNO}_3$ ), que para el método de análisis de nitrato mediante autoanalizador, con la salvedad de que, previamente, las soluciones se han sometido al proceso de oxidación.

(2) En cada tanda de oxidación se incluirá una referencia de nitrógeno orgánico (EDTA) de concentración  $4\text{ }\mu\text{M}$  N-EDTA y una referencia de nitrato  $4\text{ }\mu\text{M}$  N- $\text{NO}_3$ .

(3) Se procederá también a la oxidación y análisis de la solución oxidante cada vez que se prepare una nueva solución.

### (4) Preparación de referencias de DON.

(4.1) **Solución madre:** disolver 186.2 mg de EDTA en agua Milli-Q, en matraz aforado y enrasar a 0.1 l. La solución tiene una concentración de 10 mM. Guardar en la oscuridad, refrigerada en botella de vidrio. La solución es estable durante meses.

(4.2) **Solución de referencia.** Añadir 2 ml de la solución anterior a un matraz aforado que contiene 5 l de agua de mar filtrada de baja concentración de nutrientes (reactivo 4, del método de determinación manual de SRP). La solución tiene una concentración de  $4\text{ }\mu\text{M}$  de N-EDTA. Repartir la solución en botellas de polycarbonato de 60 ml (Nalgene) y congelar.

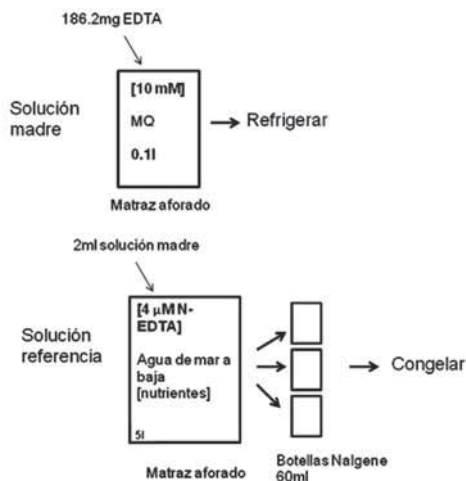
### (5) Preparación de referencias de $\text{NO}_3$

(5.1) **Solución madre:** disolver 202.2 mg de  $\text{KNO}_3$  en agua Milli-Q, en matraz aforado y enrasar a 0.1 l. La solución tiene una concentración de 20 mM. Guardar en la oscuridad, refrigerada en botella de vidrio. La solución es estable durante meses.

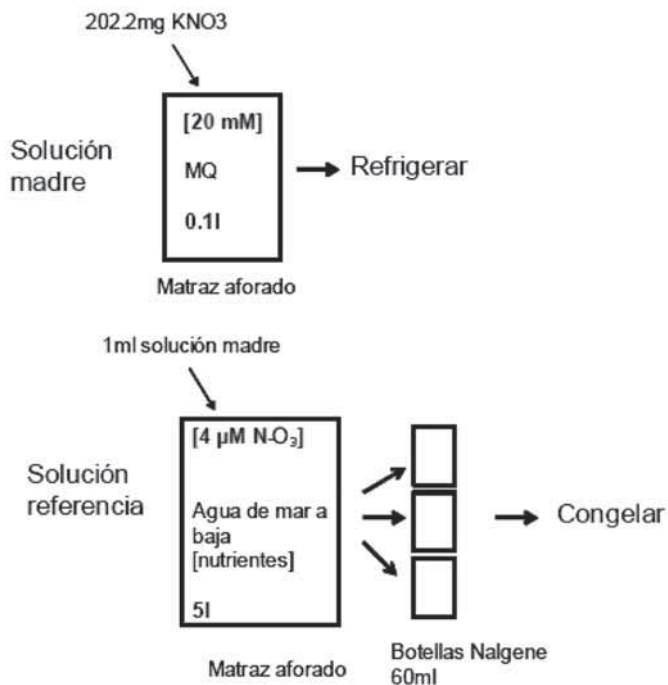
(5.2) **Solución de referencia.** Añadir 1 ml de la solución anterior a un matraz aforado que contiene 5 l de agua de mar filtrada de baja concentración de nutrientes (reactivo 4, del método de determinación manual de SRP). La solución tiene una concentración de  $4\text{ }\mu\text{M}$  de N- $\text{NO}_3$ . Repartir la solución en botellas de polycarbonato de 60 ml (Nalgene) y congelar.

## Esquema de preparación de referencias

### *Referencia orgánica:*



### *Referencia inorgánica:*



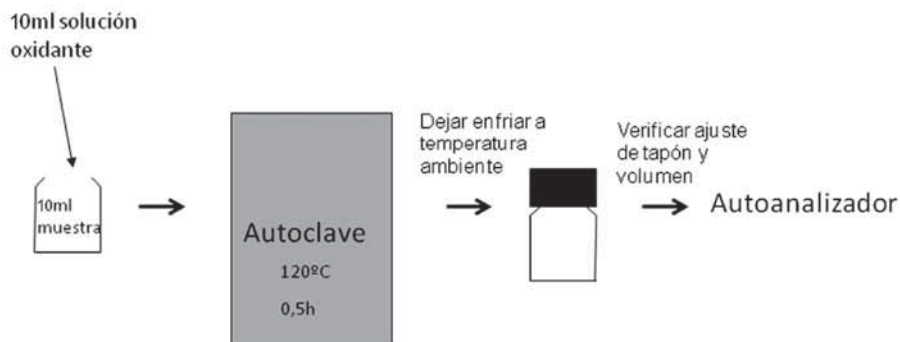
## Descripción de la técnica

### *Oxidación*

A cada muestra de 10 ml (en botella de pyrex de tapón rojo), tomadas siguiendo el protocolo Muestreo de nutrientes inorgánicos disueltos, nitrógeno (TN) y fósforo (TP) totales:

- (1) Añadir 10 ml de solución oxidante.
- (2) Cerrar herméticamente y autoclavar a 120 °C durante 0.5 h.
- (3) Enfriar el autoclave hasta temperatura ambiente antes de abrir.
- (4) Comprobar que los tapones de las botellas siguen firmemente unidos y que no ha habido variaciones de volumen. Guardar refrigeradas hasta el momento de su análisis.
- (5) Analizar las concentraciones de nitrato mediante el método de análisis de nutrientes inorgánicos por autoanalizador.

### Cuadro sinóptico de la técnica



### Control de calidad

La reproducibilidad se verificará con referencias preparadas en agua de mar, que se analizarán al mismo tiempo que las muestras (ver en calibración).

### Referencias

GRASSHOFF, K., K. KREMLING, M. EHRHARDT. 1999. *Methods of seawater analysis*. Wiley-VCH.





# **Análisis manual de la concentración de fósforo reactivo soluble (SRP) por el método espectrofotométrico de la formación del complejo azul de fosfomolibdato**

Vidal, M.; Teixidor, I.; Galindo, M.

*Departament d'Ecologia, Universitat de Barcelona*

## **Finalidad. Campo de aplicación**

Se trata de un método manual de análisis espectrofotométrico. Permite aumentar el límite de detección. Para ello la lectura de la absorbancia se hace en cubeta de 10 cm de paso de luz. De esta forma, con un buen espectrofotómetro, se pueden determinar concentraciones de 0.01  $\mu\text{M}$ .

## **Conceptos generales**

El fósforo reactivo soluble (SRP) alude al fósforo disuelto en el medio en forma de ortofosfato, además de la fracción orgánica e inorgánica que resulta liberada a la solución debido a las condiciones ácidas de la reacción.

## **Equipamiento necesario**

- Placa de agitación magnética.
- Espectrofotómetro.

## **Reactivos u otro material fungible**

- Botellas de borosilicato de tapón blanco de 60 ml.
- Pipetas automáticas.
- Puntas de pipeta.

- Cubetas de 10 cm de vidrio óptico rectangulares.
- Pipeta multi-step.
- Jeringas de distintos volúmenes para pipeta multi-step.
- Botellas de polietileno de 1 l, 0.1 l, 0.25 l.
- Botella de vidrio pyrex de 0.1 l, 0.25 l, 0.5 l, 1 l.
- Matraz aforado de vidrio de 1 l.
- Matraz aforado de 5 l.
- Erlenmeyers/Vasos de precipitados de: 0.25 l, 0.10 l, 0.05 l.
- Imanes magnéticos.
- Filtros de policarbonato de 2  $\mu\text{m}$  y 5  $\mu\text{m}$ .
- Pipetas aforadas de 1, 2 y 5 ml.
- Pipetas graduadas de 1 y 5 ml.
- Bandejas.
- Papel de secar.
- Guantes.

### *Reactivos*

- (1) Ácido sulfúrico ( $1.835 \text{ g cm}^{-3}$ , 96%).
- (2) Ácido ascórbico ( $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6$ ).
- (3) Heptamolibdato amónico tetrahidrato ( $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ).
- (4) Tartrato de antimonio y potasio ( $\text{K}(\text{SbO})\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_6$ , con o sin  $1/2 \text{ H}_2\text{O}$ ).
- (5) Dihidrógeno fosfato de potasio ( $136.09 \text{ g/mol}$ ).

### *Preparación de los reactivos:*

(0<sub>1</sub>) Todo el material debe lavarse en ácido diluido y aclararse 3 veces con agua Milli-Q previo a su uso.

(0<sub>2</sub>) Para evitar al máximo la posibilidad de contaminación, las botellas de análisis estarán numeradas y se usarán siguiendo el mismo orden.

(1) **Solución de ácido sulfúrico de concentración  $4.5 \text{ mol dm}^{-3}$ .** Añadir 0.5 l del ácido concentrado a 1.5 l de agua Milli-Q. Dejar enfriar y diluir a 2 l en matraz aforado de vidrio. Guardar en botella de polietileno. Es la misma solución que la usada en el método de análisis de TP.

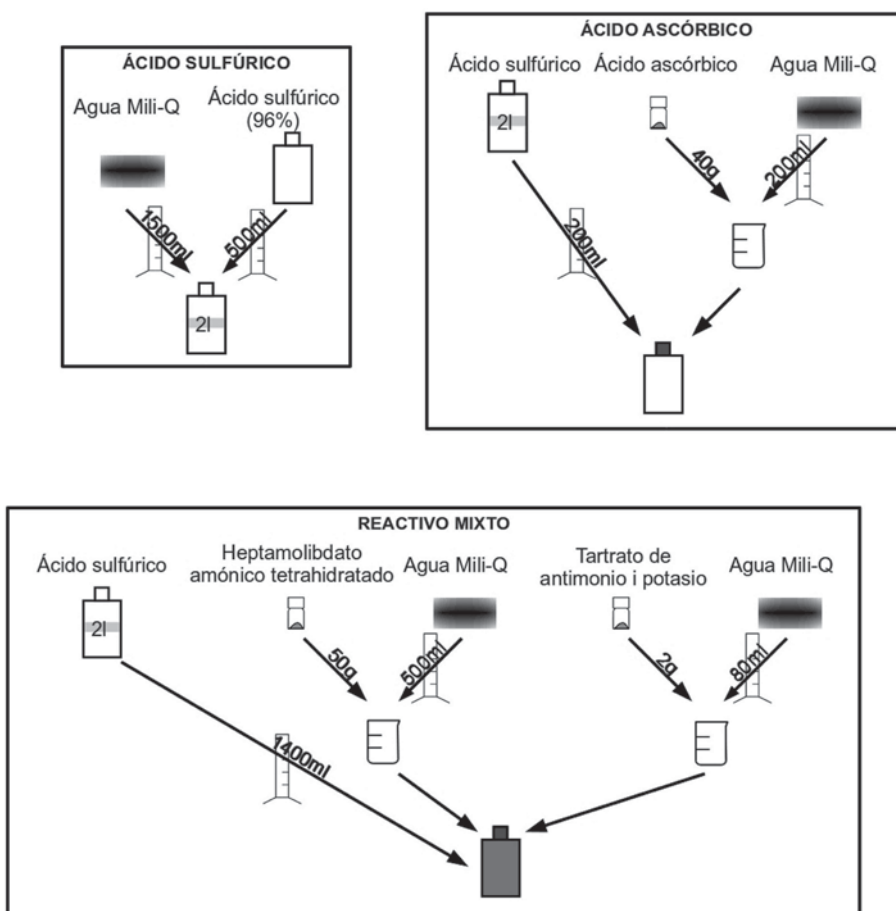
(2) **Solución ácida de ascórbico.** Disolver 40 g de ácido ascórbico ( $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6$ ) en 200 ml de agua Milli-Q; a continuación añadir 200 ml de la solución de ácido sulfúrico 4.5 M (reactivo 1). Guardar en botella de vidrio pyrex de 0.5 l refrigerada. El reactivo se puede usar durante una semana, siempre que permanezca sin color.

#### **(3) Reactivo mixto.**

(3.1) Disolver 50 g de heptamolibdato amónico tetrahidrato en 500 ml de agua Milli-Q.

- (3.2) Disolver 2 g de tartrato de antimonio y potasio en 80 ml de agua Milli-Q.
- (3.3) Llenar una botella de borosilicato pyrex con 1400 ml de ácido sulfúrico (reactivo 1) y poner en un agitador magnético en agitación continua.
- (3.4) Añadir la solución de molibdato.
- (3.5) Añadir la solución de tartrato.
- (3.6) Guardar en botella de vidrio ámbar refrigerada. El reactivo es estable durante varios meses.

(4) **Agua de mar de baja concentración de nutrientes.** Se recogerá en una zona de mar abierto, de baja concentración de nutrientes. Filtrar agua directamente del continuo, a través de un filtro Whatmann GF/F, y verter en garrafas de 20 l. Guardar en la oscuridad.



## Calibración

(1) Se llevará a cabo la calibración del equipo una vez al mes, mediante el análisis de las dos series A y B de patrones.

(2) **Preparación de patrones de dihidrógeno fosfato de potasio ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ).**

(2.1) **Solución madre de fosfato de concentración 10 mM.** Disolver 136.09 mg en agua Milli-Q a la que se ha añadido 0.2 ml de ácido sulfúrico (reactivo 1), enrasar en matraz aforado de 100 ml. Guardar en botella de vidrio pyrex refrigerada. La solución es estable durante meses.

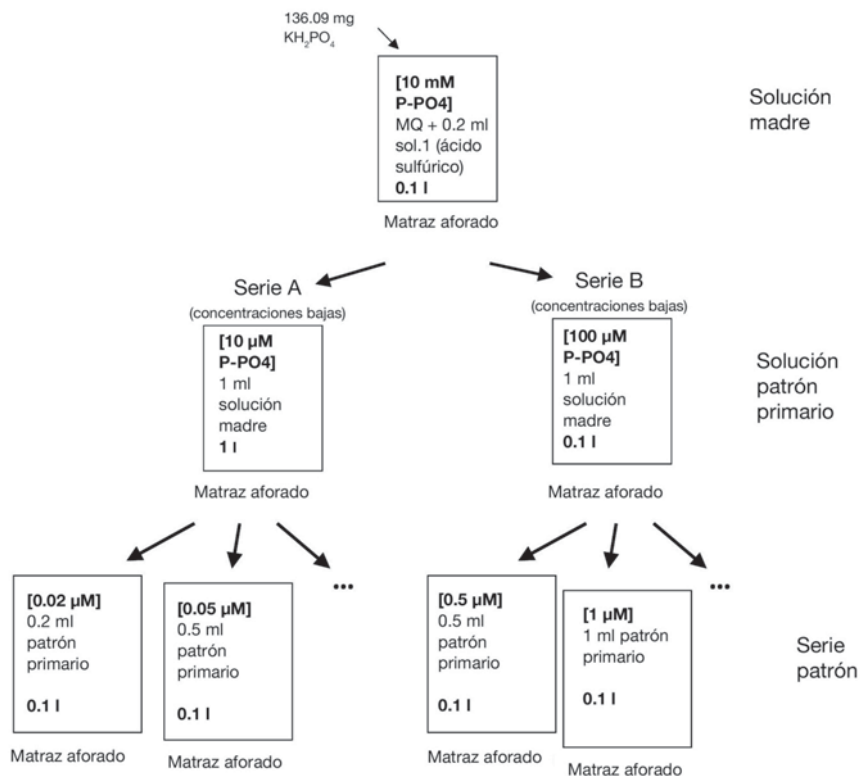
(2.2) **Solución de patrón primario.** Se prepararán dos soluciones, para las series de concentraciones bajas y altas, respectivamente.

**Serie A** (para concentraciones bajas): Diluir 1 ml de la solución madre con agua Milli-Q en matraz de vidrio aforado y enrasar a 1 l. Guardar en botella de vidrio pyrex, o policarbonato, refrigerada. La solución tiene una concentración de 10  $\mu\text{M}$  P- $\text{PO}_4$ .

**Serie B** (para concentraciones altas): Diluir 1 ml de la solución madre con agua Milli-Q en matraz de vidrio aforado y enrasar a 0.1 l. Guardar en botella de vidrio pyrex o policarbonato, refrigerada. La solución tiene una concentración de 100  $\mu\text{M}$  P- $\text{PO}_4$ .

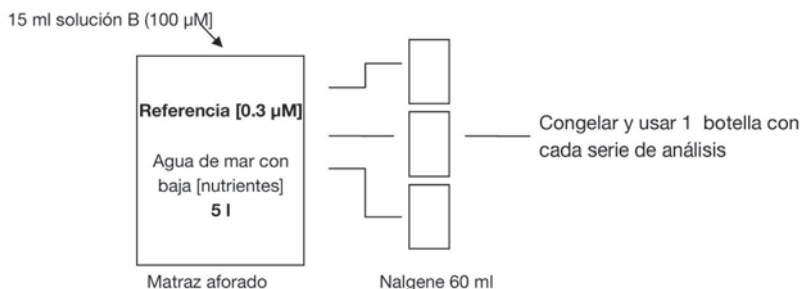
(2.3) **Serie patrón.** Se preparan a partir de la solución de patrón primario correspondiente A o B, en matraces de vidrio aforado de 100 ml. **Se preparan en agua de mar de baja concentración de nutrientes** (reactivo 4). El detalle de la preparación de las distintas soluciones se indica en la tabla a continuación.

	Patrón primario (ml)	MQ (ml) (enrasar)	[ $\text{PO}_4$ ] $\mu\text{M}$
Solución A [10 $\mu\text{M}$ ]	0.1	100	0.01
	0.2	100	0.02
	0.5	100	0.05
	1	100	0.1
	2	100	0.2
Solución B [100 $\mu\text{M}$ ]	0.5	100	0.5
	1	100	1
	2	100	2
	3	100	3

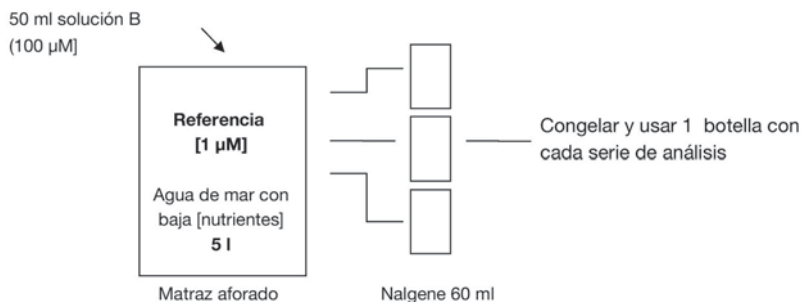


(3) En cada tanda de muestras se analizará una referencia de concentración de  $0.3 \mu\text{M}$  y otra de  $1 \mu\text{M}$ .

(3.1) Referencias de baja concentración de  $\text{PO}_4$ . Añadir 15 ml de la solución B de patrón primario  $100 \mu\text{M}$  a un matraz aforado de 5 l y llenar con agua de mar de baja concentración de nutrientes (reactivo 4). La solución tiene una concentración de  $0.3 \mu\text{M}$   $\text{P-PO}_4$ . Repartir la solución en botellas de polycarbonato de 60 ml (Nalgene) y congelar.



(3.2) **Referencias de alta concentración de  $\text{PO}_4$ .** Añadir 50 ml de la solución B de patrón primario  $100 \mu\text{M}$  a un matraz aforado de 5 l y llenar con agua de mar de baja concentración de nutrientes (reactivo 4). La solución tiene una concentración de  $1 \mu\text{M P-PO}_4$ . Repartir la solución en botellas de polycarbonato de 60 ml (Nalgene) y congelar.



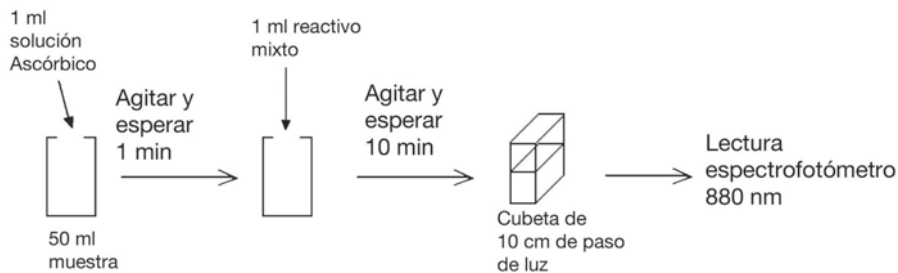
(4.0) El material deberá lavarse en baño ácido y aclararse 3 veces con agua Milli-Q previo a su uso.

### Descripción de la técnica

A cada muestra de 50 ml:

- (1) Añadir 1 ml de la solución de Ascórbico, agitar y esperar 1 minuto.
- (2) Añadir 1 ml de reactivo mixto y agitar.
- (3) Esperar 10 minutos.
- (4) Verter en una cubeta de 10 cm de paso de luz y leer en espectrofotómetro a 880 nm. Se debe realizar el autozero a 880 nm con una cubeta con agua Milli-Q.

### Cuadro sinóptico de la técnica



### Control de calidad

La reproducibilidad se verificará con referencias preparadas en agua de mar, que se analizarán al mismo tiempo que las muestras (ver en calibración).

Periódicamente se analizarán además muestras de laboratorios de referencia.

### Referencias

GRASSHOFF, K., K. KREMLING, M. EHRHARDT. 1999. *Methods of seawater analysis*. Wiley-VCH.





# Determinación de fósforo total (TP) y particulado ( $P_{\text{part}}$ ) por el método de la oxidación con persulfato en medio ácido

Vidal, M.; Teixidor, I.; Galindo, M.

*Departament d'Ecologia, Universitat de Barcelona*

## Finalidad. Campo de aplicación

Protocolo para la oxidación de fósforo orgánico y posterior análisis de fosfato. Con la aplicación del protocolo en muestras no filtradas se obtiene la concentración total de fósforo (TP). Las muestras se toman según el protocolo «Muestreo de nutrientes inorgánicos disueltos, nitrógeno (TN) y fósforo (TP) totales». El fósforo orgánico disuelto (DOP) se obtiene a partir de la diferencia respecto al particulado en suspensión ( $P_{\text{part}}$ ) y el fósforo reactivo soluble ( $\text{DOP} = \text{TP} - P_{\text{part}} - \text{SRP}$ ).

## Conceptos generales

El fósforo orgánico disuelto y particulado es un producto de la actividad de los organismos. Por consiguiente, tiende a acumularse en las capas superficiales de los océanos. El fósforo orgánico disuelto constituye un recurso nutritivo de especial relevancia en el océano oligotrófico.

## Equipamiento necesario

- Autoclave.
- Espectrofotómetro.
- Centrífuga.

## Reactivos u otro material fungible

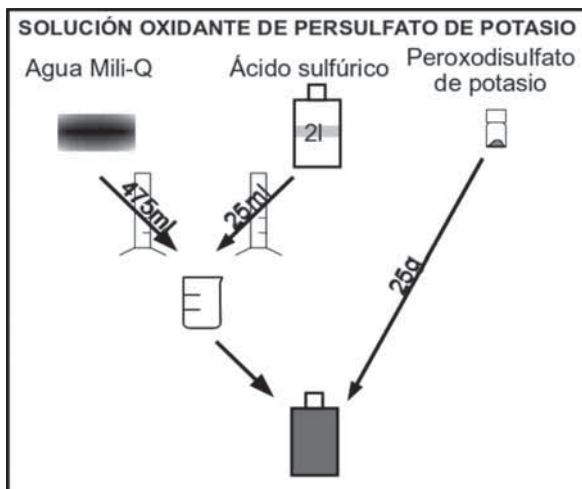
- Botellas pyrex de tapón de rosca y teflón (color rojo) de 50 ml.
- Botellas de borosilicato de tapón blanco de 60 ml.
- Pipetas automáticas, 1 y 5 ml.
- Puntas de pipeta.
- Probetas de vidrio de 10, 50 y 100 ml.
- Probetas de plástico de 250 ml.
- Matraces aforados de 0.1 l, 1 l, 5 l.
- Botellas de policarbonato de 0.2 l, 0.5 l, 1 l.
- Botellas de policarbonato Nalgene de 60 ml.
- Pipeta multi-step.
- Jeringas para pipeta multi-step.
- Dosificador 1 – 5 ml.

## Reactivos

- (1) Ácido sulfúrico ( $1.835 \text{ g cm}^{-3}$ , 96%).
- (2) Peroxodisulfato de potasio ( $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ ).
- (3) Sal hidratada de adenosín trifosfato disódico ( $551.14 \text{ g/mol}$ ).

## Preparación de los reactivos:

(1) **Solución de ácido sulfúrico de concentración  $4.5 \text{ mol dm}^{-3}$**  (reactivo 1 del método manual de análisis de SRP). Añadir 500 ml del ácido concentrado a unos 1.5 l de agua Milli-Q. Dejar enfriar y diluir a 2 l en matraz aforado. Guardar en botella de polietileno.



(2) **Solución oxidante de persulfato de potasio.** Diluir 25 ml de ácido sulfúrico  $4.5 \text{ M}$  con agua Milli-Q hasta 500 ml (medidos en probeta). Disolver 25 g de peroxodisulfato de potasio ( $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ ). Guardar esta solución saturada a temperatura ambiente en una botella de polietileno de 0.5 l y protegida de la luz directa, durante una semana.

## Calibración

(1) Se utiliza la misma serie patrón, a partir de dihidrógeno fosfato de potasio, que para el método de análisis de SRP, con la salvedad de que, previamente, las soluciones se han sometido al proceso de oxidación.

(2) En cada tanda de oxidación se incluirán una referencia de fósforo orgánico (ATP) de concentración  $0.3 \mu\text{M}$  P-ATP y una referencia de fosfato  $0.3 \mu\text{M}$  P- $\text{PO}_4$  (ver la preparación de la referencia de baja concentración de fosfato del método de SRP manual).

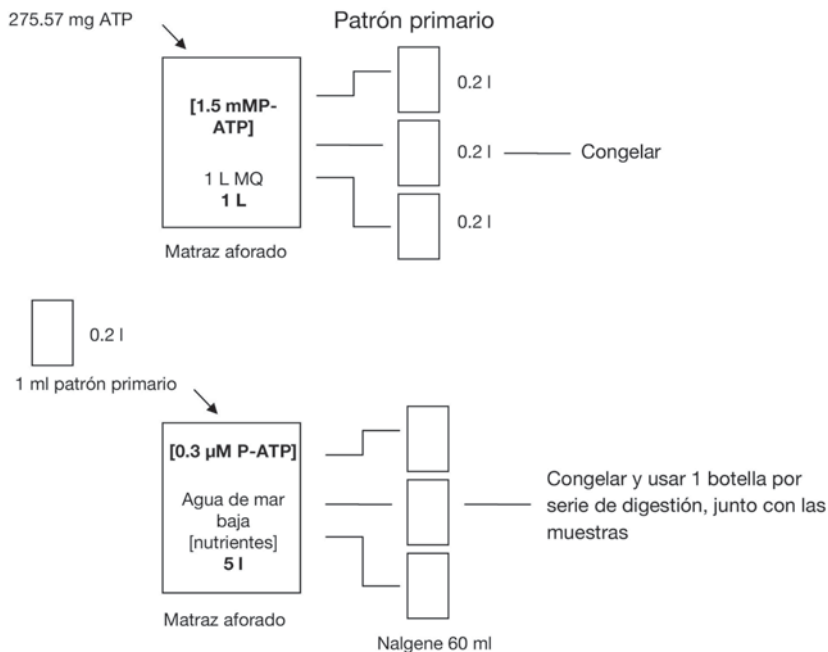
(3) Se procederá también a la oxidación y análisis de la solución oxidante cada vez que se prepare una nueva solución.

### (4) Preparación de la referencia de ATP.

(4.1) **Solución primaria:** disolver 275.57 mg de ATP en agua Milli-Q, en matraz aforado y enrasar a 1 l. La solución tiene una concentración de 1.5 mM. Repartir en botellas de polycarbonato de 0.2 l y guardar congeladas.

(4.2) **Solución de referencia.** Añadir 1 ml de la solución anterior a un matraz aforado que contiene 5 l de agua de mar de baja concentración de nutrientes (reactivo 4, del método manual de determinación de SRP). La solución tiene una concentración de  $0.3 \mu\text{M}$  de P-ATP. Repartir la solución en botellas de polycarbonato de 60 ml (Nalgene) y congelar.

### *Esquema de preparación de referencias de DOP*



## Descripción de la técnica

### *Oxidación del fósforo total (TP)*

A cada muestra de 30 ml (en botella de pyrex de tapón rojo) [ver el protocolo de «Muestreo de nutrientes inorgánicos disueltos, nitrógeno (TN) y fósforo (TP) totales»]:

- (1) Añadir 2.4 ml de solución oxidante.
- (2) Cerrar herméticamente y autoclavar a 120 °C durante 0.5 h.
- (3) Enfriar el autoclave hasta temperatura ambiente antes de abrir.
- (4) Comprobar que los tapones de las botellas siguen firmemente unidos y que no ha habido variaciones de volumen. Dejar enfriar. Una vez digeridas, el análisis de fosfato puede demorarse 1-2 días.
- (5) Transferir todo el volumen (32.4 ml) a las botellas de borosilicato de 60 ml para el posterior análisis del fósforo reactivo soluble.

### *Oxidación del fósforo particulado ( $P_{part}$ )*

Se sigue el mismo protocolo anterior, con la salvedad de que la muestra consiste en el filtro [con el material en suspensión, ver protocolo de *Filtración en rampa con presión positiva para el análisis del carbono, nitrógeno, fósforo particulado (C/N y P)...*] que es introducido en 30 ml de agua Milli-Q, y previo al análisis, las muestras son introducidas en tubos para su centrifugación.

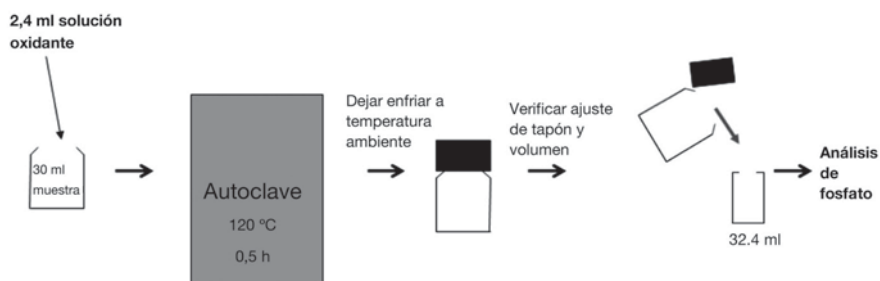
### *Análisis de la concentración de fosfato*

De las muestras digeridas de TP y  $P_{part}$  se toman 32.4 ml:

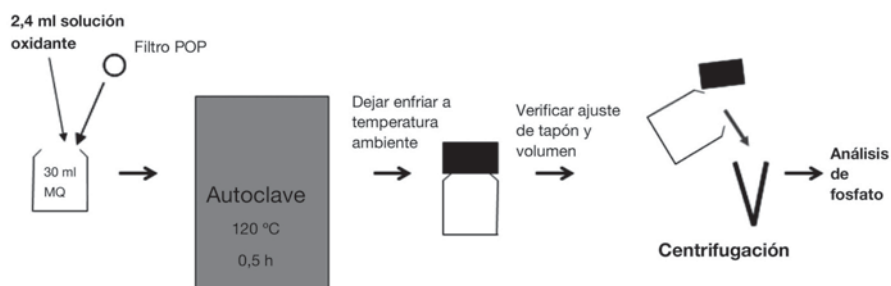
- (1) Añadir 0.65 ml de la solución de ascórbico agitar y esperar 1 minuto.
- (2) Añadir 0.65 ml de reactivo mixto y agitar.
- (3) Esperar 10 minutos.
- (4) Verter en una cubeta de 10 cm de paso de luz y leer en espectrofotómetro a 880 nm. Realizar el autozero a 880 nm con una cubeta llena de agua Milli-Q.

## Cuadro sinóptico de la técnica

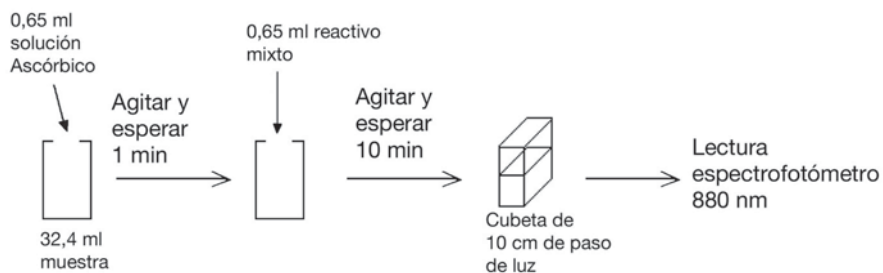
### *Determinación de fósforo total (TP)*



### *Determinación de fósforo particulado ( $P_{part}$ )*



### *Análisis de fosfato*



## Control de calidad

La reproducibilidad se verificará con referencias preparadas en agua de mar, que se analizarán al mismo tiempo que las muestras (ver en calibración).

## Referencias

GRASSHOFF, K., K. KREMLING, M. EHRHARDT M. 1999. *Methods of seawater analysis*. Wiley-VCH.

## Muestreo de carbono orgánico total (TOC) y nitrógeno total (TN)

<sup>1</sup>Álvarez-Salgado, X. A.; <sup>1</sup>Nieto-Cid, M.; <sup>1</sup>Pazó, M. J.; <sup>1</sup>Vieitez, V.;  
<sup>2</sup>Romera-Castillo, C.; <sup>2</sup>Marrasé, C.; <sup>3</sup>Piedeleu, M.; <sup>4</sup>Fernández Castro, B.

<sup>1</sup>*Instituto de Investigaciones Mariñas (CSIC)*

<sup>2</sup>*Institut de Ciències del Mar (CSIC)*

<sup>3</sup>*Universidad de las Palmas de Gran Canaria*

<sup>4</sup>*Universidade de Vigo*

### Finalidad. Campo de aplicación

Protocolo de recogida y conservación de muestras de agua para el análisis simultáneo de carbono orgánico total (TOC) y nitrógeno total (TN) por el método de oxidación catalítica a alta temperatura, que se realizarán en el laboratorio base.

### Conceptos generales

La materia orgánica disuelta es aquella fracción de la materia orgánica presente en los océanos que no es retenida por un filtro cuyo tamaño de poro oscila entre 0.2 y 1  $\mu\text{m}$  dependiendo del método utilizado. Por el contrario, la materia orgánica particulada es aquella que queda retenida en el filtro. En el océano abierto, las concentraciones de materia orgánica particulada son tan bajas, 1-2  $\mu\text{mol C l}^{-1}$ , que se acostumbra a no filtrar las muestras para minimizar el riesgo de contaminarlas en el proceso de filtración. Este es el caso de Malaspina.

Los océanos contienen aproximadamente  $660 \cdot 10^{15}$  g de C en forma de materia orgánica disuelta, cantidad similar a la de carbono acumulado en la atmósfera en forma de  $\text{CO}_2$  o la de carbono orgánico presente en los ecosistemas terrestres. La materia orgánica disuelta juega un papel clave en los ciclos biogeoquímicos en ecosistemas marinos: la fracción lábil (<5% del total) contribuye a la producción regenerada, la fracción semilábil (<20% del total) a la producción nueva y es un componente fundamental de la

bomba biológica de almacenamiento transitorio de carbono antropogénico en los océanos y la fracción refractaria (>75% del total) contribuye al almacenamiento permanente de carbono antropogénico a través de la llamada bomba microbiana.

### Reactivos u otro material fungible

- Guantes de polietileno o nitrilo (sin polvo).
- Estadillo de recogida de muestras.
- Libreta de incidencias.
- Material de librería (rotuladores, bolígrafos, lápices, etc.).
- Ampollas de vidrio de 10 ml selladas con papel de aluminio y calcinadas a 450 °C durante 24 horas.
- Etiquetas de 20 mm x 20 mm.
- Ácido fosfórico ( $\text{H}_3\text{PO}_4$ ) al 25% (en frasco de vidrio con tapón de teflón).
- Micro-dispensador de ácido fosfórico ( $\text{H}_3\text{PO}_4$ ) al 25%.
- Gradilla de plástico para muestrear con ampollas.
- Rollo de papel de aluminio.
- Gradilla de metal para sellado de ampollas al calor.
- Bombona butano (para sellado de ampollas al calor).
- Quemador para bombona butano (para sellado de ampollas al calor).
- Bandeja de papel de aluminio (para sellado de ampollas al calor).
- Pinza de acero inoxidable de 25 cm (para sellado de ampollas al calor).
- Gafas de seguridad (para sellado de ampollas al calor).
- Mechero (para sellado de ampollas al calor).
- Bolsas zip, plástico de burbujas y cajas de cartón (para almacenamiento de ampollas).

### Descripción de la técnica

#### *Recogida, conservación y almacenado de las muestras*

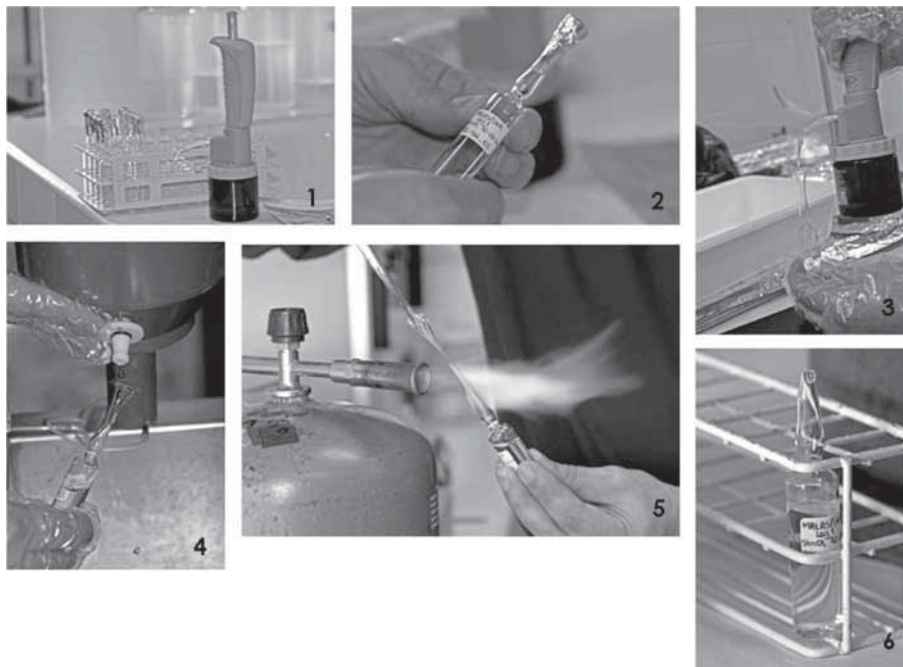
- Rellenar el estadillo registrando el nº de estación, nº de CTD, hora del lance del CTD, botellas y profundidades de las que se toman las muestras. Anotar cualquier incidencia en el espacio dedicado a “observaciones”.



- Etiquetar las ampollas escribiendo MSP-HES o MSP-SDG en la 1ª línea (según se trate del *BIO Hespérides* o *Sarmiento de Gamboa*), la fecha en la 2ª línea, y la estación, profundidad y botella en la 3ª línea.
- Ponerse guantes de polietileno o nitrilo.
- Colocar las ampollas en una gradilla de plástico (1 por profundidad, excepto en el máximo de salinidad del agua profunda, que se tomarán por duplicado en el caso del *BIO Hespérides*; y 2 en todas las profundidades en el caso del *BIO Sarmiento de Gamboa*), retirarle la cubierta de papel aluminio y añadir 50  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_3\text{PO}_4$  al 25% (con micro-dispensador) a cada una de ellas. Tapar las ampollas con una lámina de papel de aluminio.
- Tomar las muestras directamente de la botella Niskin correspondiente (sin usar tubos y sin enjuagar) en las ampollas de vidrio llenándolas 5 mm por debajo de la línea de corte de la ampolla). Al finalizar el llenado de las ampollas, volver a taparlas con la lámina de papel aluminio.
- Sellar las ampollas al calor, comprobando al cabo de 10 minutos si hay pérdidas. El sellado debe realizarse inmediatamente después de la recogida de las muestras, en un laboratorio con atmósfera limpia (libre de disolventes orgánicos).
- Colocar las ampollas en bolsas zip (9 en cada una), y las bolsas zip en cajas de cartón almohadilladas con plástico de burbujas y conservarlas en nevera (4 °C).
- Volumen necesario: 20 ml.

### Cuadro sinóptico de la técnica

Se presenta una secuencia de fotografías numerada mostrando los pasos más relevantes del proceso de recogida y conservación de muestras de agua para el análisis simultáneo de carbono orgánico total (TOC) y nitrógeno total (TN). (1) ampollas tapadas en gradilla de plástico; (2) etiquetado de ampolla; (3) adición de 50  $\mu\text{L}$  de 25%  $\text{H}_3\text{PO}_4$  con microdispensador; (4) recogida de la muestra directamente de la botella Niskin; (5) sellado al calor de ampolla; (6) ampolla enfriando en gradilla metálica antes de comprobar si está correctamente sellada.



### Control de calidad

- Las ampollas de vidrio de 10 ml deben haberse tapado con papel de aluminio y calcinado a 450 °C durante 24 horas para eliminar trazas de materia orgánica.
- En el microdispensador, el 25%  $\text{H}_3\text{PO}_4$  debe estar en contacto únicamente con elementos de vidrio y teflón.

# Muestreo de carbono y nitrógeno orgánico volátil

Ruiz Halpern, S.

*Instituto Mediterráneo de Estudios Avanzados (UIB-CSIC)*

## Finalidad. Campo de aplicación

Técnica destinada a la cuantificación de carbono orgánico volátil tanto en la atmósfera como disuelto en el agua, para la evaluación del *pool* oceánico así como de los flujos difusivos brutos aire-agua/agua-aire y los flujos difusivos netos de intercambio entre la atmósfera y el océano.

## Conceptos generales

El flujo difusivo *neto* (Fwa) aire-agua, de cualquier compuesto se puede estimar mediante:

$$Fwa = k (Cw - Cg/H')$$

Donde Cw y Cg son las concentraciones disueltas y en fase gaseosa, respectivamente, k el coeficiente de transferencia de masa aire-agua y H' es la constante adimensional de la ley de Henry (corregida para temperatura) H' se define como la razón entre la fase gaseosa y la disuelta cuando el compuesto está en equilibrio

$$H' = C_{geq}/C_{weq}$$

Si el objetivo es estimar el intercambio aire-agua de carbono orgánico, hay que definir conceptos operacionales para el carbono orgánico en fase gaseosa (GOC, en sus siglas en inglés: Gaseous Organic Carbon) y el carbono orgánico disuelto intercambiable (EDOC, en sus siglas en inglés: Ex-

changeable Dissolved Organic Carbon). De esta manera el flujo difusivo neto de carbono orgánico es:

$$F_{wa,oc} = k (EDOC - GOC/H')$$

Por tanto, EDOC es una estimación de todo el carbono orgánico disuelto en el agua que puede ser volatilizado y  $GOC/H'$  es una estimación de todo el carbono orgánico gaseoso que se puede absorber en el agua.

Asimismo, ciertos compuestos orgánicos gaseosos contienen nutrientes (nitrógeno y fósforo) y se pueden estimar los flujos netos de nutrientes de la misma manera.

### Equipamiento necesario

- Nitrógeno de alta pureza (C-50 o superior, ver Figura 3).
- Regulador de gas con espiga para Nitrógeno (ver Figura 3).
- Botellas de vidrio de 1 L, con difusor de placa de vidrio porosa (ver Figura 3).
- Trampas de vidrio de 100 ml con difusores de placa de vidrio porosa (ver Figura 1).
- Llaves de tres vías (ver Figura 3).
- Tubo de Teflón fino (ver Figura 1).
- Tubo de silicona fino (ver Figura 1).

### Reactivos u otro material fungible

- Agua ultrapura libre de carbono (MiliQ, Simplicity o para cromatografía).
- $H_3PO_4$  "Reagent grade" concentrado (85%).
- Ampollas de vidrio mufladas (450 °C, 4,5 horas) (ver esquema).
- Tubos para nutrientes HDPE (ver esquema).
- Tubos para amonio HDPE (ver esquema).

### Descripción de la técnica

#### *Muestreo de GOC*

GOC se determina indirectamente por el procedimiento descrito abajo, pues este método da una estimación de  $GOC/H'$ , que no corresponde realmente a la concentración en fase gaseosa, sino a la fase disuelta equilibrada con aire. En cualquier caso esto tiene ventajas a la hora de calcular el flujo difusivo neto.

Para muestrear GOC y nutrientes asociados a GOC, se equilibra aire atmosférico libre de fuentes de contaminación cercanas (si se muestrea desde un braco asegurarse que el motor está apagado o estamos a sotavento de las emisiones), durante 30 minutos en agua ultrapura acidificada con  $\text{H}_3\text{PO}_4$  libre de carbono orgánico (MiliQ, simplicity o agua para cromatografía), y sin acidificar para el muestreo de los nutrientes asociados.

### *Procedimiento*

Colocar un filtro (GF/F 25 mm, sin muflar) en un tubo de teflón largo mediante un porta filtros, colocar el extremo del tubo de teflón por donde entrará el aire en un lugar ventilado y protegido de fuentes de contaminación.

En aire fresco:

- Burbujear durante 30 minutos.
- A un flujo de  $500\text{--}600\text{ ml min}^{-1}$  (Equivalente burbujas de pequeño tamaño, que no hagan subir el nivel del agua ultrapura).
- 50 ml de agua ultrapura acidificada CON  $50\text{ }\mu\text{l}$  de  $\text{H}_3\text{PO}_4$ , para GOC.
- 50 ml de agua ultrapura SIN acidificar, para Nutrientes asociados.

1: Portafiltros con filtro Whatman GF/F 25mm (no necesita ser muflado).

2: Difusores (uno para GOC otro para nutrientes asociados.\*

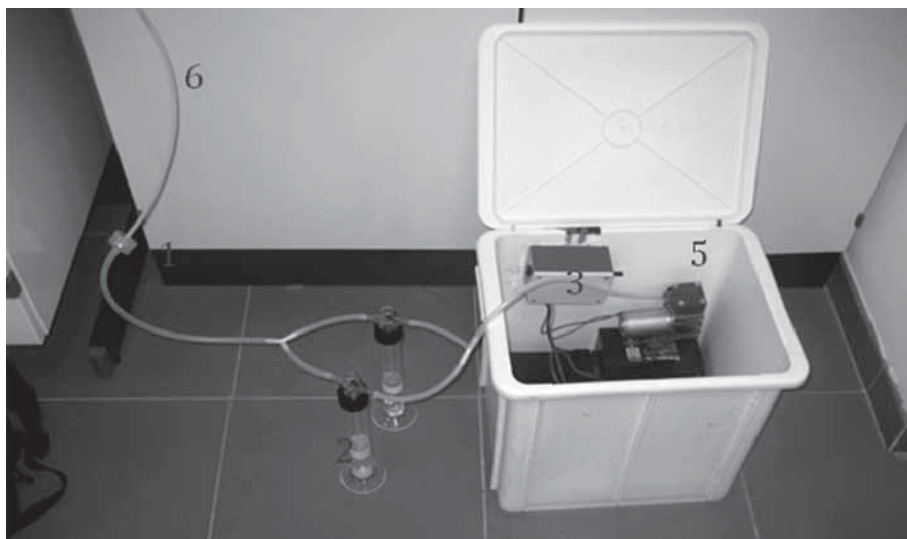


Figura 1. Circuito para muestreo de GOC.

\* Si el flujo es desigual entre los dos difusores, se puede colocar una llave de tres vías en cada difusor y regular un poco el flujo. Si no se toman nutrientes asociados, solo hace falta conectar un difusor.

- 3: Interruptor de puesta en marcha y potenciómetro para regular el nivel de burbujeo (el burbujeo ha de ser mínimo,  $500-600 \text{ ml min}^{-1}$ , pocas burbujas que no hagan subir el nivel del agua ultrapura).
- 4: Batería de ácido plomo 12V (cargar regularmente).
- 5: Bomba de vacío.
- 6: Toma de aire. Colocar en lugar ventilado libre de fuentes de contaminación.

### *\*\*\*Consideraciones relevantes*

La bomba de vacío ha de colocarse al final del circuito y que actúe desde ahí. Así se evita que el aire no pase por la bomba antes de pasar por los difusores (se minimiza el riesgo de contaminación).

El difusor ha de conectarse de la manera adecuada, esto es con la entrada de aire conectada a la entrada del difusor con la vara de vidrio y placa porosa y la salida de aire (hacia la bomba) conectada al otro extremo. Si no la presión hará subir el agua por la vara y enviarlo a la bomba (la bomba no se estropea, pero hay que limpiar todo de nuevo y volver a colocarlo).

Utilizar siempre los mismos difusores para nutrientes y no mezclarlos (la acidificación contamina con fósforo y da datos malos de nutrientes).

### *Conservación de las muestras*

El agua ultrapura se transfiere a 2 ampollas de vidrio previamente mufladas a  $450^\circ\text{C}$  durante 4,5 horas y se sellan bajo llama, enjuagar con muestra las ampollas antes de rellenarlas (agua ultrapura acidificada). Una vez en el laboratorio se analizan mediante un analizador de carbono orgánico total (Shimadzu TOC series o similar). IMPORTANTE: no burbujear la muestra en el analizador.



Figura 2. Detalle del sellado de las ampollas.

### *Muestreo de EDOC*

EDOC y los nutrientes asociados a EDOC se determinan purgando 1 l de agua de muestra (esta no se acidifica. Agua de mar, río o lago) con  $N_2$  de alta pureza (C-50 o superior) durante 5-8 minutos en 50 ml de agua ultrapura acidificada, para el muestreo de EDOC y sin acidificar para el muestreo de los nutrientes asociados. El flujo para la purga es de 500/600 ml de  $N_2$   $\text{min}^{-1}$ , equivalente a un flujo muy pequeño, prácticamente al mínimo, las burbujas deben ser de aproximadamente el mismo tamaño que para GOC y que no hagan subir el nivel de agua.

1 l de agua de muestra en cada botella (agua de mar, dulce, de incubación, etc.).

50 ml de agua ultrapura acidificada con 50  $\mu\text{l}$  de  $H_3PO_4$ , para EDOC.

50 ml de agua ultrapura SIN acidificar, para nutrientes asociados.

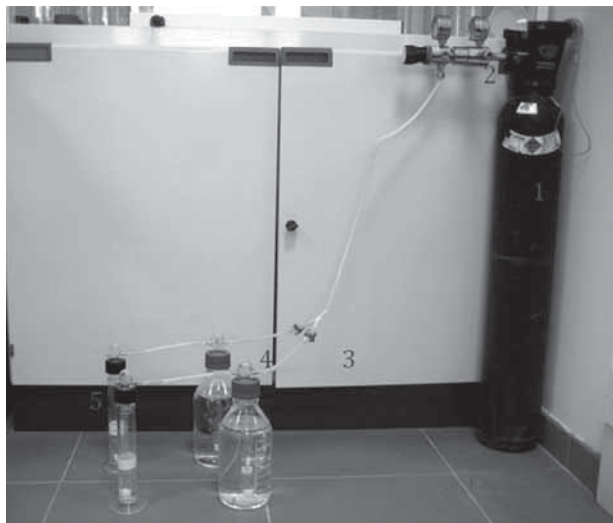


Figura 3. Circuito para muestreo de EDOC.

1. Botella de nitrógeno ultrapuro C-50 o superior.
2. Manómetro con espiga para nitrógeno.
3. Llaves de 3 vías para regular flujo.
4. Botellas con 1 l de agua de muestra.
5. Difusores con agua ultrapura. Si no se toman nutrientes asociados solo es necesario conectar una botella con muestra a un difusor.

#### *\*\*\*Consideraciones relevantes*

Tanto el difusor como las botellas de muestra han de conectarse en el sentido adecuado. El flujo de nitrógeno siempre ha de entrar en la vara de vidrio con placa porosa para provocar el burbujeo de la muestra. Si se co-

necta el revés la botella con muestra, el agua recorrerá el tubo y entrará en el recipiente con agua ultrapura (hay que limpiar y volver a empezar). Si se conecta el difusor al revés, la presión de nitrógeno desplazará al agua por la vara de vidrio y saldrá por el extremo final.

Utilizar siempre los mismos difusores para nutrientes y no mezclarlos (la acidificación contamina con fósforo y da datos malos de nutrientes).

### *Conservación de las muestras*

El agua ultrapura se transfiere a sendas ampollas de vidrio mufladas y se sigue el mismo esquema que para GOC.

### NOTAS SOBRE EL MUESTREO DE NUTRIENTES

Para el muestreo de los nutrientes asociados tanto a GOC como a EDOC. Se puede hacer simultáneamente en ambos casos, para ello solo hay que dividir las conducciones y en el caso de EDOC, usar 1 l de agua para cada muestra (EDOC y nutrientes asociados). Diferencias importantes con respecto al muestreo de carbono orgánico son:

- No acidificar el agua ultrapura.
- Conservar congelados en tubos HDPE de 13 ml (tapón blanco).
- Analizar en un FIA (flow injection analysis).
- El agua para  $\text{NH}_4^+$  se transfiere a tubo HDPE de 14 ml (tapón rojo).
- Enjuagar los tubos y tapones con un poco de muestra (agua ultrapura burbujeada) antes de rellenarlos.

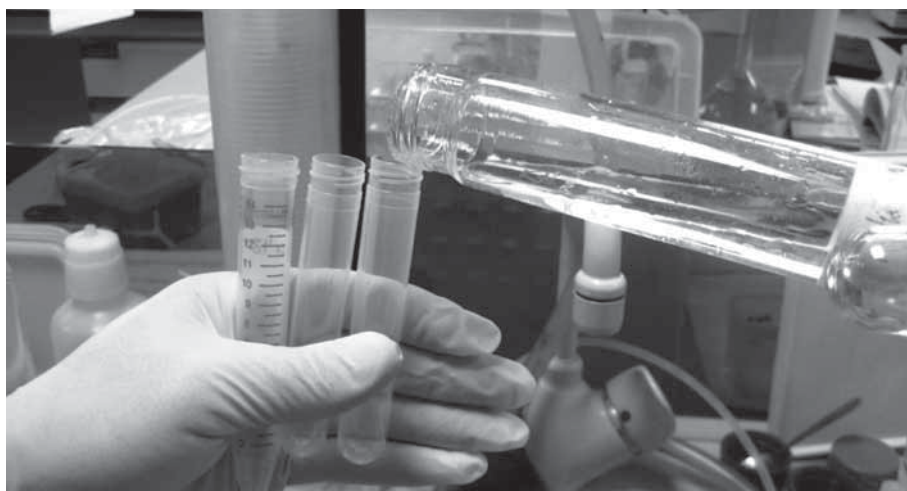


Figura 4. Detalle para el muestreo de nutrientes asociados tanto a GOC como a EDOC.



Si hay muestras que recoger a distintas profundidades o de varios experimentos, se puede hacer simultáneamente para ahorrar tiempo.

NOTA: TODO el material debe ser debidamente limpiado antes de ser usado. Conviene muflar todo el material de vidrio antes de ser utilizado por primera vez o antes de embarcarse en la campaña. Una vez en la campaña, si no se dispone de mufla, enjuagar con ácido diluido (3.7%) y después con agua de muestra las botellas 3-4 veces antes de ser usadas. Para las trampas de agua ultrapura, se recomienda enjuagar varias veces con el agua que se vaya a usar para equilibrar la muestra (con ácido para GOC-EDOC o sin ácido para nutrientes), antes de burbujearla. Jamás mezclar difusores para EDOC con difusores para nutrientes (el fósforo residual de acidificar el agua ultrapura contamina las muestras de nutrientes). También es conveniente lavar todo el material (vidrio, tubos, portafiltros, etc.) con HCl al 3.7% y enjuagarlo en agua ultrapura.

### Cuadro sinóptico de la técnica

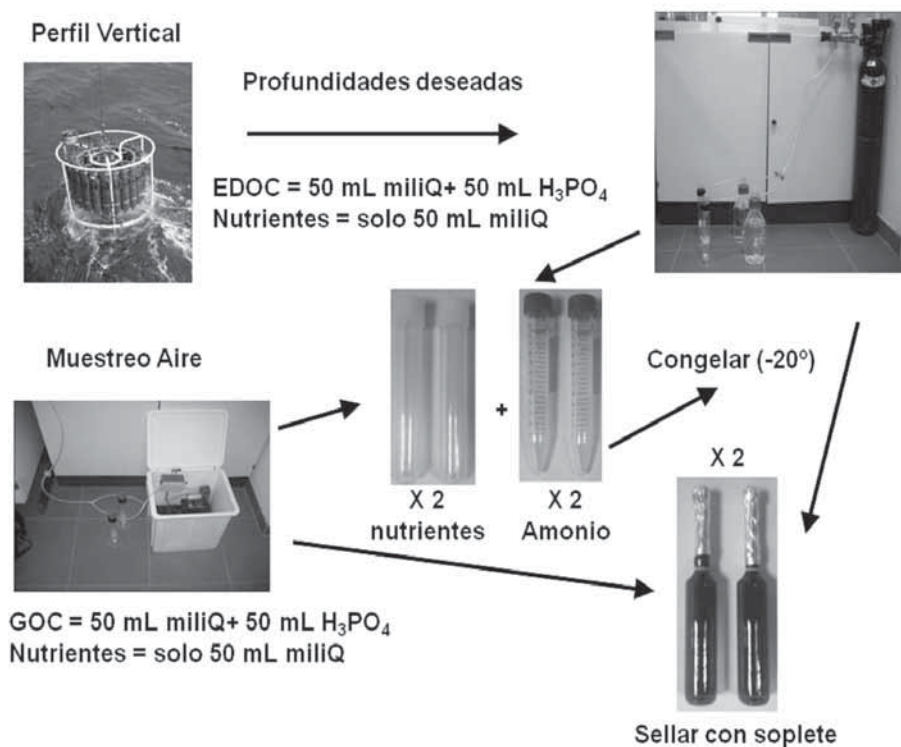


Figura 5. Cuadro sinóptico de muestreo de carbono orgánico.

Cálculo de los resultados

Cálculo del Flujo Aire-Agua de VOC

$Kwco_2 = (0.24 \cdot U_{edoc}^2 + 0.061 \cdot U_{edoc}) \cdot 24 / 100$  (Nightingale et ál. 2000)  
( $m \, d^{-1}$ )

$Vis = 1.002 \cdot 10^{((1.3272 \cdot (20 - T_w) - 0.001053 \cdot (T_w - 20)^2) / (T_w + 105))}$

$D = 0.000000074 \cdot (2.6 \cdot 18)^{0.5 \cdot (T_w + 273)} / (vis \cdot 120^{0.6})$

$Sc = vis / D \cdot 0.01$  (adimensional)

$KGOC = Kwco_2 \cdot (Sc / 600)^{-0.5}$  ( $m \, d^{-1}$ )

$Fvol = KGOC \cdot EDOC$  ( $mmol \, C \, m^{-2} \, d^{-1}$ )

$Fab = -KGOC \cdot (GOC / H')$  ( $mmol \, C \, m^{-2} \, d^{-1}$ )

$Faw = Fvol + Fab$  ( $mmol \, C \, m^{-2} \, d^{-1}$ )

Si  $Faw < 0$ ;  $ABS(Fab) > ABS(Fvol)$ ; flujo neto aire-agua → deposición neta de OC

Si  $Faw > 0$ ;  $ABS(Fab) < ABS(Fvol)$ ; flujo neto agua aire → volatilización neta de OC

$U_{edoc}$ = velocidad del viento a la hora del muestreo ( $m \, s^{-1}$ )

$T_w$ = temperatura de agua ( $^{\circ}C$ )

$Vis$ = viscosidad del agua

$D$ = coeficiente de difusión molecular

$Sc$ = número de Schmidt

$KGOC$ = coeficiente de transferencia de masa ( $m \, d^{-1}$ )

$H' = H'$  constante adimensional de Henry → muestrear directamente  $GOC / \leftrightarrow H =$

tiene la ventaja de no tener que estimar el valor de  $H \leftrightarrow$  que introduciría errores considerables a la hora de calcular el flujo.

$GOC / H'$  es la concentración que medimos directamente

$EDOC$  y  $GOC / H'$  is in  $\mu mol \, L^{-1} = mmol \, m^{-3}$

$Fvol$ =flujo bruto de volatilización ( $mmol \, C \, m^{-2} \, d^{-1}$ )

$Fab$ = flujo bruto de absorción ( $mmol \, C \, m^{-2} \, d^{-1}$ )

$Faw$ = flujo neto difusivo de carbono orgánico ( $mmol \, C \, m^{-2} \, d^{-1}$ )

U	SST	EDOC	GOC/H'	Vis	D	$Sc=Vis/D$	$Kwco_2$	KGOC	Fvol	Fab	Faw
m s <sup>-1</sup>	°C	μmolL <sup>-1</sup> =mmol m <sup>-3</sup>				Adimen-sional	m d <sup>-1</sup>	m d <sup>-1</sup>	mmol m <sup>-2</sup> d <sup>-1</sup>	mmol m <sup>-2</sup> d <sup>-1</sup>	mmol m <sup>-2</sup> d <sup>-1</sup>
A1	B1	C1	D1	E1	F1	G1	H1	I1	J1	K1	

$$\text{Vis:} = 1.002 \cdot 10^{((1.3272 \cdot (20 - B1) - 0.001053 \cdot (B1 - 20)^2) / (B1 + 105))}$$

$$\text{D:} = 0.000000074 \cdot (2.6 \cdot 18)^{(0.5)} \cdot (B1 + 273) / (E1 \cdot 120^{(0.6)})$$

$$\text{Sc} = \text{Vis} / \text{D:} = (E1 / F1) \cdot 0.01$$

$$\text{KwCO}_2: = (0.24 \cdot (A1)^2 + 0.061 \cdot (A1)) \cdot 24 / 100$$

$$\text{KGOC:} = H4 \cdot (G1 / 600)^{(-0.5)}$$

$$\text{Fvol:} = I3 \cdot C1$$

$$\text{Fab:} = -I3 \cdot D1$$

$$\text{Faw:} = J1 + K1$$

Estas son las fórmulas que han de introducirse en las celdas correspondientes, siendo la celda A1 la primera del cuadrante superior izquierdo.

### Control de calidad

Una vez al día se realizará un blanco burbujeando las trampas de 100 ml directamente con Nitrógeno de alta pureza. El agua se acidificará para el blanco de carbono, y se dejará pura para el blanco de nutrientes asociados. La conservación de los blancos es exactamente igual que la de las muestras.

Hay que extremar las precauciones para mantener el material siempre en óptimas condiciones de limpieza.

### Referencias

- DACHS, J., M. L. CALLEJA, C. M. DUARTE, S. DEL VENTO, B. TURPIN, G. J. HERNDL, S. AGUSTÍ. 2005. «High atmosphere-ocean exchange of organic carbon in the NE subtropical Atlantic». *Geophys. Res. Lett.* 32: L21807, doi: 10.1029/2005GL023799.
- RUIZ-HALPERN, S., M. K. SEJR, C. M. DUARTE, D. KRAUSE-JENSEN, T. DALSGAARD, J. DACHS, S. RYSGAARD. 2010. «Air water exchange and vertical profiles of organic carbon in a subarctic fjord». *Limnol. Oceanogr.*: 55, 1733-1740 doi:10.4319/lo.2010.55.4.1733.



# Recogida de muestras de materia orgánica particulada (POM) y disuelta ultrafiltrada (UDOM) en el océano profundo

<sup>1</sup>Nieto-Cid, M.; <sup>1</sup>Álvarez-Salgado, X. A.; <sup>1</sup>Vieitez dos Santos, V.; <sup>1</sup>Pazó, M. J.;  
<sup>2</sup>Marrasé, C.; <sup>2</sup>Romera-Castillo, C.; <sup>3</sup>Fernández-Castro, B.; <sup>3</sup>Graña, R.

<sup>1</sup>*Instituto de Investigaciones Marinas (CSIC)*

<sup>2</sup>*Institut de Ciències del Mar (CSIC)*

<sup>3</sup>*Universidad de Vigo*

## Finalidad. Campo de aplicación

Metodología para obtener muestras de materia orgánica particulada (POM) y disuelta ultrafiltrada (UDOM o HMW), o de alto peso molecular, en aguas profundas, con la siguiente periodicidad de estaciones: AAB..., donde se ultrafiltrarán 220 l en las tipo B-BGQ y 110 en las tipo B- $\mu$ BB. (nota: en todas las tiradas de roseta una botella Niskin será sustituida por una botella con una red para zooplancton, y otra botella Niskin se utilizará para realizar medidas de biogeoquímica, es decir, 22 botellas en las estaciones tipo B). En las estaciones tipo B-  $\mu$ BB no se recogerá material particulado (POM) ya que el volumen de agua de mar disponible no es suficiente.

La concentración de materia orgánica disuelta (DOM) en los ecosistemas marinos es demasiado baja como para realizar una caracterización directa y completa de la misma. Los mayores avances en este sentido se están consiguiendo al combinar métodos de ultrafiltración y técnicas de resonancia magnética nuclear (RMN).

## Conceptos generales

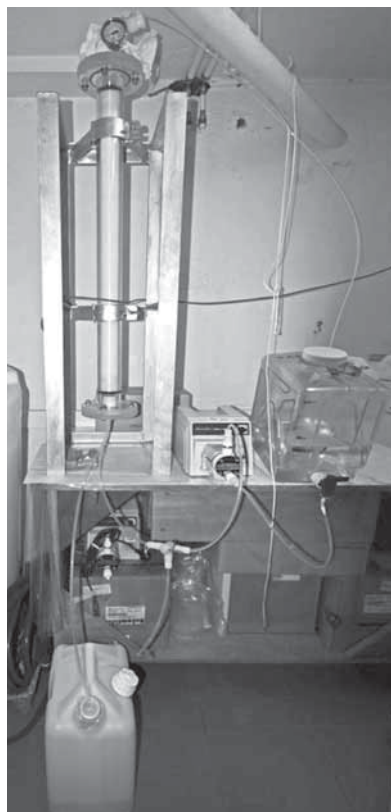
La UDOM (>1 KDa) se concentrará por ultrafiltración, recuperándose entre el 10% y el 40% de la DOM total, para caracterizarla tanto ópticamente, a través de espectrometría de absorbancia y fluorescencia, como químicamente, con técnicas de RMN, espectrometría de masas, cromatogra-

fía líquida de alta resolución (HPLC), análisis elemental, e isótopos y radio-marcadores de carbono.

Además, la mitad de cada muestra se destinará a la colección Malaspina, para en un futuro realizar medidas de variables químicas por técnicas no disponibles en la actualidad o que aún requieren grandes cantidades de material.

### Equipamiento necesario

- Sistema de ultrafiltración de flujo tangencial construido en metacrilato y teflón y provisto de membrana de ultrafiltración de 1 kDa. El sistema se conecta a una bomba peristáltica que recircula el agua a través de la membrana, entre un recipiente donde se concentra el material de alto peso molecular (HMW), en el cual se va añadiendo la muestra (CONTROL) con una segunda bomba peristáltica, y otro donde se recoge el material de bajo peso molecular (LMW). El sistema lleva además un manómetro en el extremo superior, para comprobar que se está ejerciendo siempre la misma presión (~5 psi).
- Espectrofluorímetro (Fluoromax-4).
- Espectrofotómetro (Shimadzu UV- 2401).



### Reactivos y otro material fungible

- Estadillo de recogida de muestras (cubrir uno por cada muestra).
- Libreta de incidencias.
- Material de librería (rotuladores, bolígrafos, lápices, etc.).
- Tijeras.
- Parafilm.
- Bolsas de basura negras grandes, opacas.
- Dinamómetro.
- Cronómetro/reloj.

- Plástico transparente para proteger el sistema.
- Bolsas de plástico de distintos tamaños.
- Gomas elásticas.
- Pulpos, sargentos y cabo para amarrar instrumentos y material.
- Guantes de polietileno y vinilo (sin polvo).
- Guantes de fregar.
- 5 m Tubo de tygon para conectar a las botellas al muestrear.
- 15 Bidones de 20 l para recoger el agua de las botellas oceanográficas.
- 1 Bidón de 20 l para mezclar la sosa y el ácido después del lavado, y así neutralizarlos.
- 2 Jarras (5 l) de plástico.
- 2 Embudos de plástico.
- 1 Cubo.
- 25 Filtros Pall Acropak 1500 0.8/0.2  $\mu\text{m}$ .
- 1 Soporte Millipore (316 Stainless Sanitary 293 mm Filter Holder, YY30 293 16).
- 1 Llave para apretar/aflojar los cierres del soporte Millipore.
- 50 Filtros GF/F de 293 mm, calcinados durante 4 horas a 450 °C.
- 2 Cubas grandes de plástico (300 l) para la muestra de agua de mar (“CONTROL”) y la porción de bajo peso molecular (“LMW”).
- 2+2 Conexiones de teflón para extraer el agua de las cubas de plástico.
- 2+1 Bombas peristálticas.
- 2 Bidones de 20 l con grifo y dos orificios en la parte superior para conectar al sistema de ultrafiltración.
- 30 Botellas de teflón de dos litros para contener la fracción de alto peso molecular (“HMW”) de las muestras una vez ultrafiltradas. Las botellas estarán etiquetadas, taradas e incluidas en el fichero de inventario y seguimiento.
- 70 Botes *Kartell*® de plástico de 50 ml para muestras de nutrientes.
- 1 Desecador de plástico.
- 3 Botes de silica gel.
- 100 Trozos de papel de aluminio calcinados (12h, 450 °C), 50 de (29x40 cm) para guardar los filtros y 50 de (15x29 cm) para colocar en el desecador.
- 3 Bidones de 10 l (con marcas de 5 y 10 l) para ácido, sosa y agua destilada/milli-Q de lavado.
- 1 bote de lejía para el lavado de las cubas de plástico entre legs (cuando la persona saliente y la entrante se encuentren).
- 1 l HCl (ácido clorhídrico, para preparar ácido diluido para lavar el sistema, 5 ml de HCl concentrado por cada 5 l de agua destilada).
- Probeta de 10 ml para medir el HCl.
- 1 Micropipeta de 5 ml y tips (para preparar la disolución de HCl de lavado, en sustitución de la probeta).

- 50 Viales con 2 g de NaOH (para preparar sosa diluida para lavar el sistema, añadiéndolos a 5 l de agua destilada).
- Papel de medida de pH.
- Manguera de 30 m.

### *Carbono orgánico disuelto*

- 300 Ampollas de vidrio de 10 ml tapadas con papel de aluminio y calcinadas a 450 °C durante 24 horas.
- 300 Etiquetas de 20 mm x 20 mm (para identificar las muestras recogidas en las ampollas).
- Rotuladores finos para etiquetar ampollas.
- 25%  $\text{H}_3\text{PO}_4$  (ácido fosfórico) en dos frascos de vidrio de 250 ml con tapón de teflón.
- Micro-dispensador de 25%  $\text{H}_3\text{PO}_4$ .
- Micropipeta para dispensar 50  $\mu\text{L}$  con puntas apropiadas y limpias (lejía y 10% HCl).
- Gradillas de plástico para muestreo con ampollas.
- Quemador bombona butano (para sellado de ampollas).
- Bombona butano (para sellado de ampollas).
- Bandejas de aluminio flexible (para sellado de ampollas).
- Pinzas de acero inoxidable de 25 cm (para sellado de ampollas).
- Gafas de seguridad (para sellado de ampollas).
- Mechero (para sellado de ampollas).
- Bolsas zip y cajas de cartón (para almacenamiento de ampollas).

### *CDOM*

Ver protocolo general de muestreo de materia orgánica disuelta coloreada (CDOM).

- 5 Frascos de vidrio con tapón de vidrio de 250 ml.
- 2 Cubetas prismáticas con paredes de cuarzo de 10 cm para absorbancia.
- 2 Cubetas de cuarzo de 1 cm para fluorescencia.
- 1 l HCl concentrado (37%) para preparar 1% HCl (que se usará para lavar frascos de vidrio y cubetas). Preparar añadiendo 10 ml de HCl al 37% por cada 1000 ml de agua destilada.
- Probeta de 100 ml (para medir el volumen de 37% HCl).
- $\text{NaHCO}_3$  (que se usará para neutralizar el 1% HCl una vez usado; Añadir hasta que no se produzca burbujeo (aproximadamente 8g de  $\text{NaHCO}_3$  por litro de HCl al 1%).
- Metanol (que se usará para lavar la cubeta de fluorescencia en caso de que el 1% HCl no sea suficiente).
- Caja plástico con tapa para sumergir frascos de vidrio en 10% HCl.
- 10 Cajas de KimWipes (para secar y limpiar las paredes de las cubetas).



## Calibración

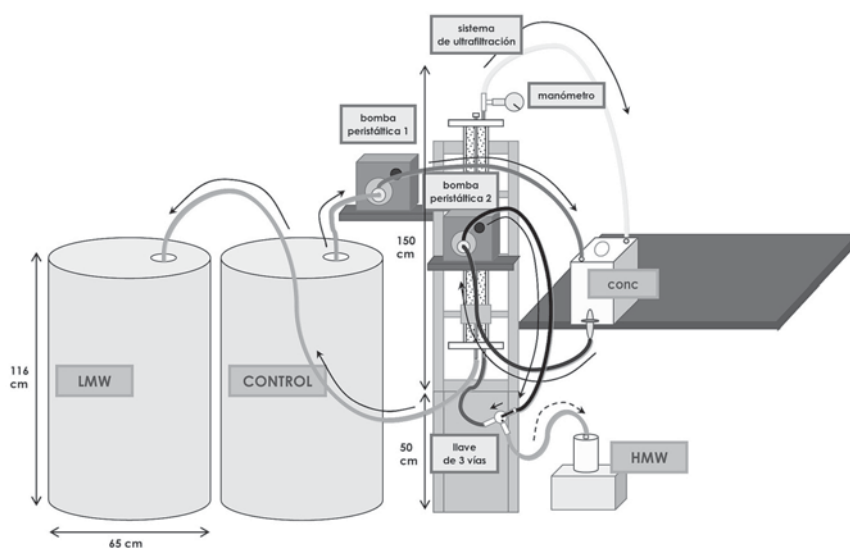
Ver el apartado de calibración para la fluorescencia en el protocolo de muestreo de materia orgánica disuelta coloreada (CDOM).

A posteriori, cuando las muestras se depositen en el laboratorio base, se hará un balance de masas de cada una de las ultrafiltraciones. Para ello se necesitarán los volúmenes de las tres fracciones (el del alto peso molecular se medirá en el laboratorio por pesada) y los valores de carbono orgánico disuelto de cada una.

## Descripción de la técnica

### 1. Sistema:

El sistema de ultrafiltración y su soporte miden un metro y medio de alto. Se colocan siempre encima de una base metálica (de medio metro) para evitar el contacto directo con el suelo, y cerca de un mesado donde se situará un bidón de plástico de 20 l con soporte inclinado. Además se requiere un espacio abierto para instalar las dos cubas de plástico de 300 l (ver Figura 1). Asimismo, se necesitará una zona de trabajo para ubicar los 15 bidones de 20 l, el sistema de filtración de material particulado y material variado como un cubo, jarras, bidones de disoluciones de lavado, etc. Un total de 2 m de poyata debería ser suficiente. Es importante colocar la cuba de plástico para el LMW cerca de un desagüe para agua de mar, ya que, eventualmente, ese volumen de agua de mar se descartará.



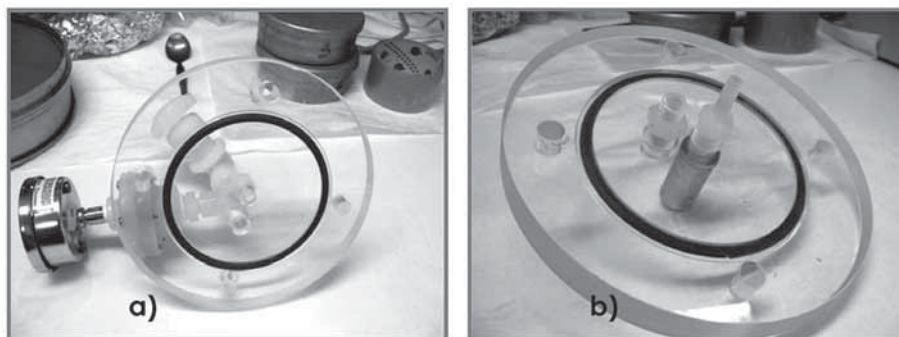


Figura 1. Ultrafiltración, y detalle de la tapa superior (a) y de la tapa inferior (b).

*2. Lavado y acondicionamiento del sistema de ultrafiltración (usar guantes de vinilo o de “frutería”):*

Entre muestra y muestra, así como al principio y al final de cada ‘leg’, se debe lavar el sistema. Los lavados consisten en hacer funcionar el sistema en modo recirculación: se desconecta del bidón “conc” el tubo que viene de la bomba peristáltica 1 (ver Figura 1, cuyo extremo se cubrirá con una bolsa limpia, atándolo con una goma), a continuación se conecta el extremo abierto del tubo de salida de la cuba del material de bajo peso molecular (conexión central, ver Figura 1, que durante la ultrafiltración está colocado dentro de la cuba LMW) a la conexión del bidón “conc” que acabamos de dejar libre (ver resultado final en Figura 2).

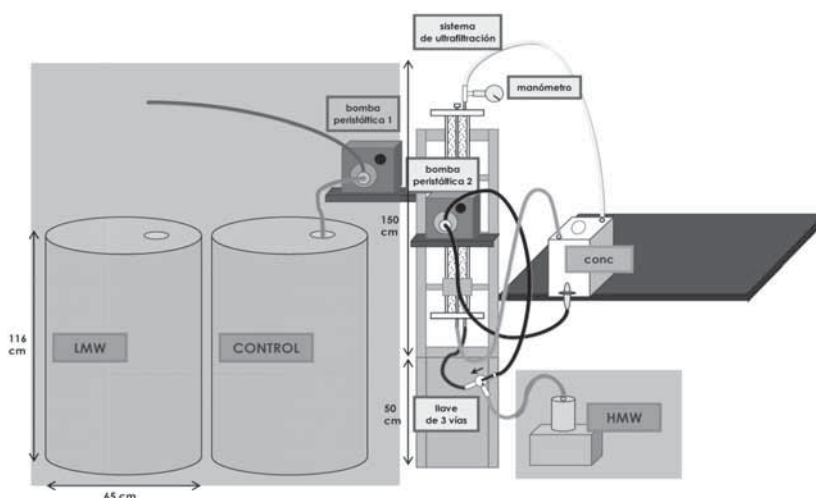


Figura 2. Recirculación.

El sistema se lava con el siguiente protocolo:

- agua Milli-Q (añadir 1 vez un volumen de 5 l), se deja recircular durante 2-3 horas (para eliminar la sal de la muestra anterior).
- sosa diluida (2 g de NaOH en 5 l de agua milli-Q) dejando recircular durante la noche.
- agua milli-Q (añadir al menos 2-3 volúmenes de 5 l), se deja recircular durante 2-3 horas con cada nuevo volumen de cada vez.
- ácido diluido (5 ml de HCl en 5 l de agua milli-Q) dejando recircular durante la noche.
- agua milli-Q (añadir al menos 3 volúmenes de 5 l), dejándolos recircular durante 4-5 horas y hasta que tengamos que muestrear la siguiente muestra (el sistema no debiera estar parado durante más de 1 hora).

Los líquidos de lavado se añaden directamente en el bidón “conc” y se eliminan del sistema en dos etapas:

i) se cierra el grifo del bidón “conc”, se desconecta el tubo de este grifo y se vacía este bidón por ese grifo, recogiendo el líquido en un cubo o en el bidón de mezcla de NaOH y HCl.

ii) a continuación se vacía la columna de ultrafiltración a través de la llave de tres vías, recogiendo el líquido en la jarra de plástico. En esta llave, un punto ROJO indica la vía que está cerrada. Durante la ultrafiltración y la recirculación se cierra la salida del HMW para que la muestra pase horizontalmente a través de la llave (Figura 3.a), para el vaciado de la columna se coloca el cierre en la vía muerta para que el sistema se vacíe por ambos lados hacia la salida del HMW (Figura 3.b).

El agua destilada/milli Q se puede verter por los fregaderos. Una vez mezclados entre sí en el bidón marcado como “Bidón para neutralización”, el ácido y la sosa también, ya que se neutralizan.

Entre *legs* el sistema se deja recirculando con agua milli-Q, cambiándola cada 2-3 días.

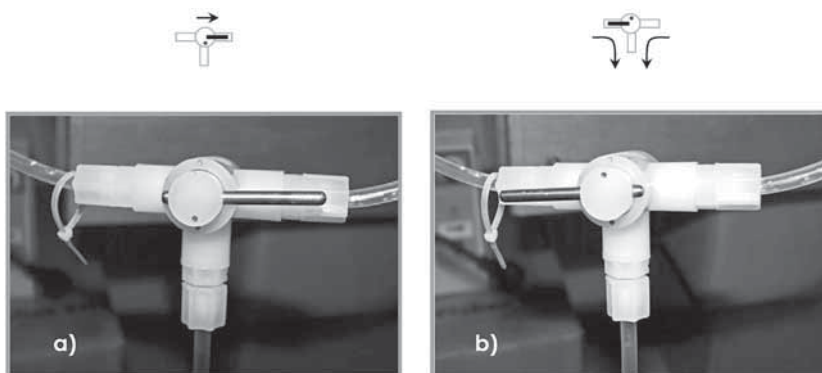


Figura 3. Llave de tres vías.

### 3. Procedimiento (usar guantes de vinilo o de “frutería”):

- Muestreo: muestrear el CTD vaciando las botellas Niskin en los bidones de 20 l con ayuda de tubos de tygon, enjuagando 2-3 veces el bidón antes de su llenado. Cada uno de los bidones llenos con agua se pesa utilizando un dinamómetro, y tras restar 3 kg al peso obtenido (debido a la corrección de la salinidad y al peso del bidón) se anota el número de bidón y el peso corregido en el estadillo, para el cálculo del volumen final. Aquí también se contabilizará todo el volumen perdido en lavados u otras acciones, todo debe ser registrado para el cálculo del volumen final de “CONTROL”.

Para cada muestra se debe rellenar la información requerida en el estadillo de UDOM de MALASPINA 2010 consistente en nombre de muestra, etapa (“leg”), estación, tirada de CTD (“cast”), fecha y hora del muestreo (local y GMT), latitud y longitud de la estación, salinidad y temperatura del agua original. A lo largo del proceso se irán apuntando: volúmenes de “CONTROL” (al finalizar la ultrafiltración), de “HMW” y “LMW” (en el laboratorio base) y el número de botella de teflón de 2 l donde se guarda el “HMW” (al recogerlo). También al finalizar se anotará la presión del sistema, el flujo medio y la duración de la filtración para la muestra, así como cualquier otra incidencia.

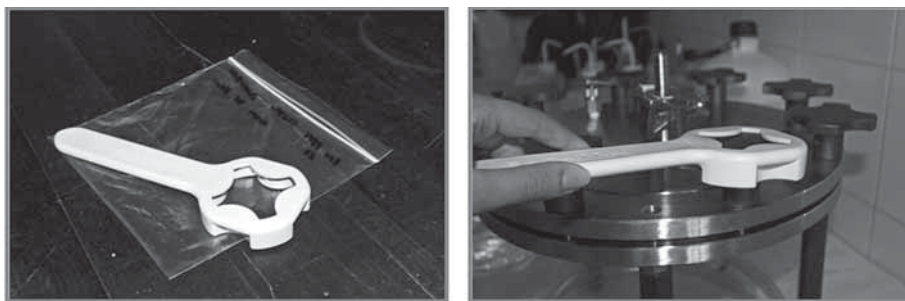


Figura 4. Llave de mano, para apretar y aflojar los cierres del sistema de filtración de POM.

- Filtración: utilizar la bomba peristáltica 1 para filtrar y en línea la muestra a través de i) un filtro de recogida del material orgánico particulado en suspensión (sistema de filtración Millipore para filtros de 293 mm de diámetro, utilizado con filtros GF/F calcinados, 4 h a 450 °C) y ii) una cápsula de filtración Pall Acropak 1500 0.8/0.2  $\mu\text{m}$  (ver Figura 5). Se debe colocar un filtro GF/F en el sistema Millipore para cada muestra (cara menos rugosa hacia arriba) utilizando las manos (con guantes nuevos y limpios), y se cierran las ocho tuercas con la llave apropiada (Figura 4), apretando lados opuestos para lograr un cierre homogéneo. Igualmente, se utilizará una nueva cápsula

sula para cada muestra donde se recoja la roseta completa para nosotros (estación tipo B-BGQ) mientras que en las estaciones tipo B- $\mu$ BB se utilizará una cápsula para cada dos estaciones, por lo cual el filtro debe ser lavado (haciendo pasar 5 l de agua milli-Q) después del primer uso y guardado en nevera (4 °C) hasta su segundo y último uso.

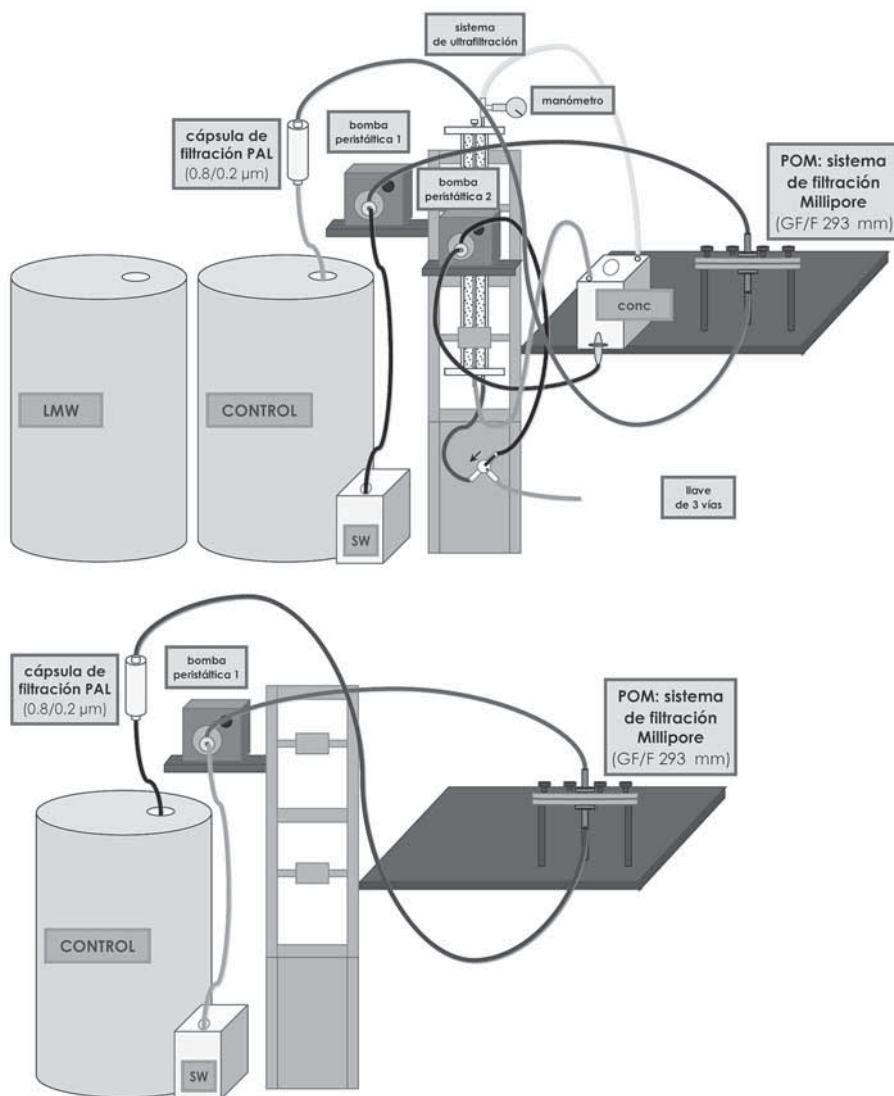


Figura 5. Filtración, la figura superior muestra el montaje completo tal y como estará en el barco y en la inferior se han dejado solo los elementos utilizados en la filtración.

Antes de comenzar se lavan los dos filtros pasando 5 l de agua milli-Q a través de ellos, y a continuación se pasa una pequeña alícuota de la muestra, alrededor de 3 l. Todos estos volúmenes se descartan. El sistema Millipore dispone de una válvula en la parte superior que debe estar abierta (posición vertical, Figura 6.a) cuando se comienza el llenado del sistema (para eliminar el volumen muerto de aire en el interior) y que se debe cerrar (posición horizontal, Figura 6.b) en el momento en el que el líquido comience a salir por ella. La cápsula de filtración también tiene una pequeña llave en la parte superior que se debe abrir hasta eliminar el aire del interior (Figura 6.c).

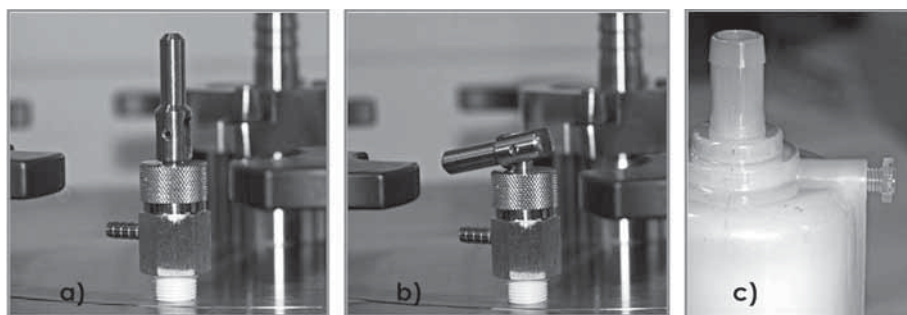


Figura 6. Detalle de las válvulas.

Después de lavar los filtros se procede a filtrar el resto la muestra y a recoger el filtrado en una de las cubas de plástico, etiquetada como “CONTROL”. Una vez terminada la filtración se abre el sistema de filtración Millipore y se retira el filtro con mucho cuidado para no romperlo (los bordes exteriores del mismo, sin muestra, se quedan pegados en la sujeción de teflón del sistema). El filtro se pliega dos veces a la mitad y se deja secando 24 horas en un desecador. Al cabo de este tiempo se envuelve en papel de aluminio calcinado y se congela a  $-80^{\circ}\text{C}$ . Etiquetado con un nombre del tipo **MHXXXAYYY101MP**, donde la M se refiere al nombre de la campaña (MALASPINA), H al nombre del barco (HESPÉRIDES), el número XXX es el número de día en el que se tomó el agua para ultrafiltrar (variable), la letra A define la ROSETA como medio de muestreo, el número YYY designa el número de estación (variable), el número 101 indica CAST 1 y número de BOTELLA NISKIN 01 (establecida por convenio para la ultrafiltración). El sufijo MP se refiere a la variable (MATERIA PARTICULADA).

El sistema de filtración Millipore se lava SOLAMENTE con abundante agua milli-Q, desmontando cuidadosamente con una pinza Millipore todas las piezas principales y los o-rings. No esperar más de 2-3 horas para su lavado.

- Ultrafiltración: con toda la muestra filtrada en la cuba “CONTROL” se procede a la ultrafiltración, conectando de nuevo la bomba peristáltica.

tica 1 como se muestra en el esquema 1. El sistema se ha lavado con agua milli-Q durante la filtración, por lo que está limpio. Ahora debemos acondicionar la membrana con la muestra, para ello se añaden aproximadamente 3 l de la muestra desde la cuba "CONTROL" al bidón "conc" utilizando la bomba peristáltica 1 (llenado hasta la marca "LÍMITE INFERIOR (3 l)" en el bidón). Se conecta el sistema en recirculación (Figura 2) y se deja recircular durante 40-60 minutos. Se elimina la muestra de acondicionamiento de igual manera que los líquidos de lavado, no se conserva.

A continuación se conecta el sistema siguiendo la Figura 1 de nuevo, y después de añadir 12-15 l de muestra de igual manera que antes (llenado hasta la marca "INICIO" en el bidón) se toma una alícuota de la muestra "CONTROL". Para ello se utiliza el frasco de vidrio de 250 ml etiquetado como "CONTROL" y se llena del agua de bidón "conc" desconectando el tubo que une ese bidón con la bomba peristáltica 2 y tomándola directamente del grifo azul. Se lava 2-3 veces y se llena completamente el frasco, el cual se conserva en nevera y oscuridad hasta el final de la ultrafiltración, para su medida conjunta con el bajo peso molecular ("LMW"). En las estaciones B-BGQ se llena además una botella de PE de alta densidad de 2 l para análisis de isótopos que nos suministrará el responsable de CSIC-EZZ en ese leg (no se lava por que se le ha añadido ácido fosfórico). El bote se etiqueta previamente con el nombre de la campaña, la etapa ("leg"), la estación y el tipo de muestra (13C-CONTROL), por ejemplo:

**MALASPINA-leg1**  
**STN-1, 13C-CONTROL**

y se conserva en la nevera a 4 °C. Una vez llenado se vuelve a conectar el tubo que une el bidón "conc" con la bomba peristáltica 2, se abre el grifo y con ambas bombas encendidas se comienza la ultrafiltración.

En la bomba 2 regulamos el flujo para que el manómetro (situado en la parte superior del sistema) indique una presión en torno a 5 psi (regulador de velocidad en posición casi horizontal, Figura 7), lo que equivale a un flujo en la salida del bajo peso molecular entre 70 y 100 ml por minuto. La bomba 1 se debe poner siempre a menos velocidad que la 2 (Figura 7) y es la que se cambia a lo largo de la ultrafiltración, para regular el volumen del bidón "conc" (para que no desborde ni se vacíe). En la libreta de notas, se hace el seguimiento de la ultrafiltración, anotando la hora y la presión del manómetro. También se mide (y anota) el flujo en la salida del "LMW", utilizando una probeta y un cronómetro (a la misma altura que la salida, y devolviendo la muestra a la cuba, por lo que hay que ser muy limpio al hacerlo). Esto se controlará y anotará más frecuentemente al principio o cuando las condiciones del sistema cambien. Además se controlará el flujo de entrada desde la bomba 1 haciendo marcas en una cinta adhesiva pe-



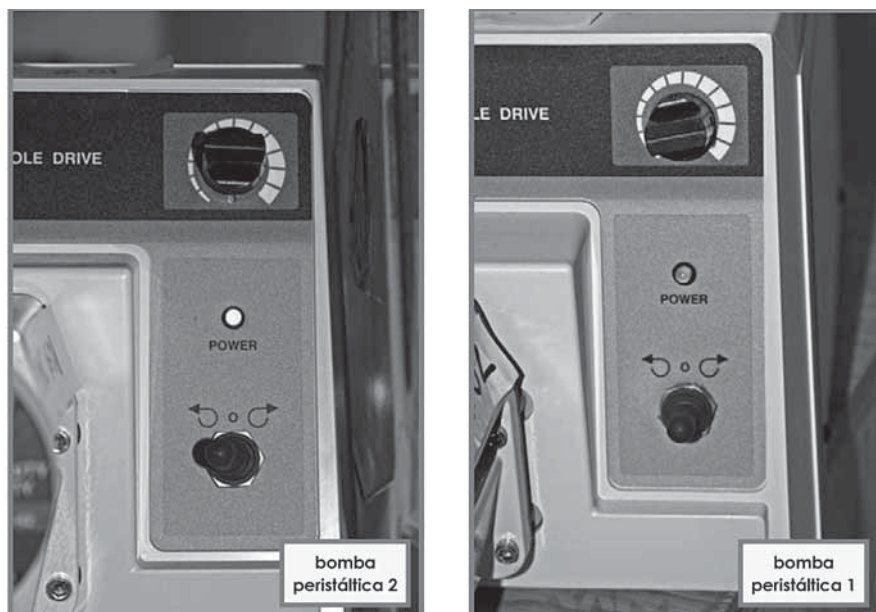


Figura 7. Detalle de las bombas peristálticas.

gada en el bidón “conc”, y que se cambiará para cada muestra. Se intentará que el sistema funcione lo más compensadamente posible.

A medida que la muestra se va concentrando, el material de bajo peso molecular se va depositando en la cuba “LMW” y el bidón “conc” donde se concentra la muestra se va rellenando con el agua de mar procedente de la cuba “CONTROL” con la bomba peristáltica 1. Lo que se intenta es que la velocidad de esta bomba sea lo más parecida a la velocidad de salida del material de bajo peso molecular, para que el sistema pueda ser *cuasi* autónomo.

Al final, cuando el volumen de muestra es reducido a menos de dos litros (marca “FINAL” en el bidón “conc”), se para la ultrafiltración (hay que prestar especial cuidado en vigilar la ultrafiltración al final para que no quedarnos sin muestra a la vez que y bombeamos aire al sistema). Se vierte la muestra en un bote de teflón (utilizando la llave de tres vías en la posición de la Figura 3.b, para recoger tanto la porción de muestra del bidón “conc” como la porción que se encuentra dentro del sistema de ultrafiltración, volumen mayoritario y que cae muy lentamente, por lo que se debe dejar vaciando durante al menos 15-20 min). Este bote (“HMW”) se sella con cinta de teflón, se introduce en dos bolsas de plástico con zip, se etiqueta la bolsa con un nombre idéntico al del material particulado (MHXX-XAYYY101UF), pero utilizando como sufijo final las iniciales UF (ULTRAFILTRACIÓN), y se congela a -20 °C.



Para muestrear el “LMW” se utiliza una bomba peristáltica para, después de homogeneizar el contenido de la cuba “LMW”, coger una muestra en un frasco de vidrio de 250 ml etiquetado como “LMW” (lavando dos veces). En las estaciones B-BGQ se llena además una botella de PE de alta densidad de 2 l para análisis de isótopos que nos suministrará el responsable de CSIC-EZZ en ese leg (no se lava por que se le ha añadido ácido fosfórico). El bote se etiqueta previamente con el nombre de la campaña, la etapa (“leg”), la estación y el tipo de muestra (13C-LMW), por ejemplo:

**MALASPINA-leg1**  
**STN-1, 13C-LMW**

y se conserva en la nevera a 4 °C. El gran volumen restante de agua de mar en la cuba “LMW” se descarta hacia la cubierta del barco a través del grifo inferior y una manguera. El líquido remanente en la cuba deberá ser extraído con la bomba peristáltica.

- Muestras/medidas a bordo: de los dos frascos de vidrio (“CONTROL” y “LMW”) se toman muestras para: nutrientes, DOC y CDOM.

### *Nutrientes*

- Utilizar botes kartell de plástico de 50 ml. Cada bote se etiqueta previamente con el nombre de la campaña, la etapa (“leg”), la estación y el tipo de muestra (NUT-CONTROL o NUT-LMW), por ejemplo:

**MALASPINA-leg1**  
**STN-1, NUT-CONTROL**

- Llenar hasta 40 ml, colocar en caja de plástico y congelar a -20 °C.

### *DOC*

(Ver protocolo general de muestreo de carbono orgánico disuelto).

- Acidificar ampollas para DOC (5 por muestra) con 50 µL de 25% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (ácido fosfórico). Las ampollas se etiquetan previamente con el nombre de la campaña, la etapa (“leg”), la estación y el tipo de muestra (DOC-CONTROL o DOC-LMW) y número de réplica, por ejemplo:

**MALASPINA-leg1**  
**STN-1, DOC-CONTROL\_01**

- Llenar las ampollas 5 mm por debajo de la línea de corte de la ampolla.
- Sellar las ampollas al fuego (comprobando al cabo de 15 minutos si hay pérdidas).
- Colocar las ampollas en bolsas zip dentro de una caja de cartón y conservarlas en nevera (4 °C).

*CDOM*

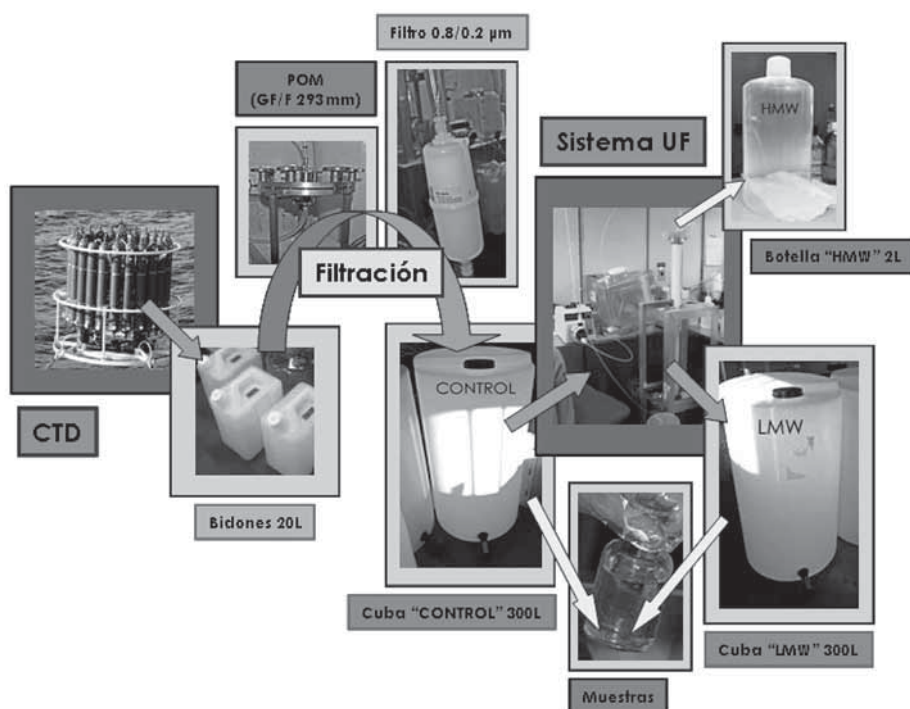
(Ver protocolo general de muestreo de materia orgánica disuelta coloreada).

- Analizar las muestras siguiendo el protocolo general de CDOM (absorción y fluorescencia), adjuntándolas al resto de las muestras del día.
- La nomenclatura a seguir para nombrar el fichero de cada muestra al usar el FLUOROMAX es:

M(leg)(stn)(tipo)

donde tipo = control o LMW (por ejemplo M1\_001control o M1\_177lmw).

## Cuadro sinóptico de la técnica



# Recogida y análisis a bordo de muestras de materia orgánica disuelta cromófora: absorbancia (aDOM) y fluorescencia (FDOM)

<sup>1</sup>Álvarez-Salgado, X. A.; <sup>1</sup>Nieto-Cid, M.; <sup>2</sup>Romera-Castillo, C.; <sup>2</sup>Marrasé, C.;  
<sup>3</sup>Serrano Catalá, T.; <sup>3</sup>Reche, I.; <sup>4</sup>Fuentes Lema, A.; <sup>4</sup>Sobrino, C.;  
<sup>5</sup>Gutiérrez, R.; <sup>5</sup>Luculano, F.; <sup>6</sup>Ortega-Retuerta, E.

<sup>1</sup>*Instituto de Investigaciones Mariñas (CSIC)*

<sup>2</sup>*Institut de Ciències del Mar (CSIC)*

<sup>3</sup>*Universidad de Granada*

<sup>4</sup>*Universidad de Vigo*

<sup>5</sup>*Instituto Mediterráneo de Estudios Avanzados (UIB-CSIC)*

<sup>6</sup>*Observatoire Océanologique de Banyuls sur Mer*

## Finalidad. Campo de aplicación

Protocolo de recogida de muestras de agua para el análisis de la absorbancia y fluorescencia de la materia orgánica cromófora y su determinación a bordo por espectrofotometría y espectrofluorimetría.

## Conceptos generales

La fracción de la materia orgánica disuelta en los océanos que absorbe luz en el rango de longitudes de onda del ultravioleta y, en menor medida, del visible, se conoce como materia orgánica disuelta cromófora. Cuando la materia orgánica disuelta cromófora se irradia con luz ultravioleta esta emite luz fluorescente característica de materiales tanto proteínicos como húmicos.

La materia orgánica disuelta cromófora se caracteriza mediante espectros de absorción entre 250 y 750 nm y matrices de excitación-emisión de fluorescencia, excitando entre 250 y 450 nm y leyendo la intensidad de emisión entre 300 y 560 nm.

En el océano abierto, las concentraciones de materia orgánica particulada son tan bajas que se acostumbra a no filtrar las muestras para minimizar el riesgo de contaminarlas en el proceso de filtración. En el caso de Malaspina se filtrarán solo las muestras de la roseta superficial. El bloque de biogeoquímica filtrará a través de filtros GF/F de 47 mm de diámetro (calcinados a 450 °C durante 4 h) con un sistema de filtración de vidrio bajo presión controlada de N<sub>2</sub>. El bloque de fitoplancton lo hará a través de filtros Millex de 0.2 µm de tamaño de poro por medio de una jeringa.

La materia orgánica disuelta cromófora modifica las propiedades ópticas de los océanos, influyendo en su transparencia tanto a la radiación UV como visible y, por tanto, afectando a la actividad biológica (protección contra el efecto dañino de la radiación UV, reducción de la producción primaria, etc.). Además, los procesos tanto fotoquímicos como microbiológicos alteran las propiedades ópticas de la materia orgánica disuelta cromófora de manera que la absorbancia y fluorescencia pueden usarse para trazar la intensidad de dichos procesos.

### Equipamiento necesario

- Espectrofotómetro Perkin Elmer lambda 850 con portacubetas para cubetas prismáticas de 10 cm de camino óptico.
- Espectrofluorímetro FLUOROMAX-4 (Jobin Yvon Horiba) con portacubetas para cubetas cuadradas de 1 cm de camino óptico.

### Reactivos u otro material fungible

- Guantes de vinilo (sin polvo) o de polietileno.
- Estadillo de recogida de muestras.
- Libreta de incidencias.
- Material de librería (rotuladores, bolígrafos, lápices, etc.).
- Frascos de vidrio de 250 ml con tapón de vidrio.
- Sistema de filtración de vidrio (x2).
- Bombona de N<sub>2</sub> ultrapuro de 20 l (x2).
- Manómetro para bombona de N<sub>2</sub> ultrapuro (x1).
- Filtros GF/F de 47 mm de diámetro calcinados a 450 °C durante 4 h (x300 u.d.).
- Patrón de referencia de agua Milli-Q en cubeta sellada (x2).
- Patrón de referencia de p-terfenilo en bloque de metacrilato (x2).
- Patrón de referencia de tetrafenilbutadieno en bloque de metacrilato (x2).
- Cubeta prismática de 10 cm con 2 ventanas de cuarzo para absorbancia (x4).
- Cubeta de 1 cm con 4 ventanas de cuarzo para fluorescencia (x4).
- HCl concentrado (37%) para preparar 1% HCl añadiendo 10 ml de 37% HCl por cada 1000 ml de agua destilada (se usará para lavar frascos de vidrio y cubetas).
- Probeta de 100 ml (para medir el volumen de 37% HCl).
- Bicarbonato sódico comercial, que se usará para neutralizar el 1% HCl una vez usado añadiendo bicarbonato hasta que se acabe el burbujeo (aprox. 8 g /litro de 1% HCl).
- Papel indicador de pH.

- Metanol, para lavar la cubeta de fluorescencia en caso de que el 1% HCl no sea suficiente
- Caja de plástico pequeña con tapa, para sumergir cubetas en 1% HCl.
- Caja de plástico con tapa, para sumergir frascos de vidrio en 1% HCl.
- Tisúes, para secar y limpiar las paredes de las cubetas (KimWipes).

## Calibración

### *Absorbancia*

De cada muestra se obtendrá un espectro de absorción entre 250 nm y 750 nm a intervalos de 1 nm. Como blanco se usará agua Milli-Q recién producida. En espectrofotómetros de doble haz, en el portacubetas de referencia se colocará una cubeta de 10 cm con agua Milli-Q recién producida evitando el desarrollo de burbujas. El agua de esta cubeta se renovará al menos al inicio de cada sesión de análisis, y cada hora si el tiempo de medida es superior a dos horas.

Los espectros de absorción se obtienen en unidades de absorbancia, por lo que no se calibran contra ninguna sustancia de referencia.

### *Fluorescencia*

Antes de comenzar la secuencia de análisis de cada estación se hará un espectro de emisión de: (1) el patrón de referencia de agua Milli-Q entre 365 nm y 450 nm excitando a 350 nm; (2) el patrón de referencia de p-terfenilo entre 310 nm y 600 nm excitando a 295 nm; y (3) el patrón de referencia de tetrafenilbutadieno entre 365 nm y 600 nm excitando a 348 nm, fijando el ancho de ranura de excitación y emisión en 5 nm y el tiempo de integración en 0.25 segundos. El área bajo el pico del patrón de referencia de agua Milli-Q, conocido como pico Raman, se dividirá entre la intensidad de fluorescencia, para expresar los valores obtenidos en unidades Raman (Lawaetz y Stedmon, 2009). Para ello:

#### **i) Encendido del instrumento**

- Encender el espectrofluorímetro en el botón situado en el lateral derecho del aparato.
- Esperar 1 minuto.
- Encender el ordenador.
- Esperar 30 minutos a que la lámpara se caliente.
- Usar cubetas con las 4 caras de cuarzo. NUNCA tocar las cubetas con los dedos, usar SIEMPRE guantes de vinilo o polietileno.

#### **ii) Iniciación del programa**

- Abrir la hoja excel “DAILY fluoroLOG.sxc” – en la que se registrará diariamente información sobre el estado del instrumento, inicial-

mente escribir fecha, usuario y horas de trabajo de la lámpara al comienzo de la sesión (en el lateral derecho del instrumento), el resto se irá completando a lo largo del **apartado 3**.

- Hacer doble clic en el icono FLUORESCENCE.
- Hacer clic en “M” para iniciar el programa (tarda unos segundos, esperar sin tocar nada).

### iii) Comprobaciones diarias del estado del instrumento

#### ● Comprobación de la Excitación

- El objetivo es comprobar la estabilidad de la intensidad de la lámpara de xenón día a día.
- Hacer clic en “Spectra”.
- En “Experiment Type”, seleccionar “excitation”.
- Usar el “experiment file” por defecto, “DfltSpectralExcitation.xml”.
- Comprobar que la configuración es Ex 200–600 nm, Em 350 nm, Ex y Em “slits” 1 nm.
- Hacer clic en “Detectors” y comprobar que el tiempo de integración es 0.1 s y que la señal R1 está seleccionada y aparece en el cuadro de “fórmulas”.
- Asegurarse de que la cámara del portacubetas está vacía y bien cerrada.
- Hacer clic en “Run” para realizar el espectro.
- Para poder visualizar los resultados, el programa preguntará por el nombre que se quiere dar al proyecto. Introducir la fecha como nombre del proyecto y un subíndice por si se hace más de una sesión por día (eg. “081104\_a” para la primera sesión del 4 Nov 2008). El proyecto se debe guardar en la carpeta “C:\Program Files\Jobin Yvon\Data\MALASPINA”.
- Cuando se haya realizado el espectro, hacer clic en el 14º botón contando desde la derecha (“Data Reader”, apariencia de visor). Acto seguido, hacer clic en el pico más alto, que debiera encontrarse a **467 nm** con una intensidad de unos 0.08-0.09 MicroAmps.
- Este espectro se grabará como “DfltEx1”.
- Registrar la posición (X) e intensidad (Y) del pico en el fichero “DAILY fluoroLOG.sxc” y en el cuaderno.
- Se pueden hacer espectros adicionales seleccionando el botón justo a la derecha de “M”. En ese caso, los espectros adicionales se grabarán con los nombres DfltEx 2, DfltEx 3, etc.

#### ● Comprobación de la emisión

##### **Espectro Raman de la cubeta sellada con agua Milli-Q**

- Esta prueba permite comprobar la deriva de la lámpara.
- Hacer clic en “M”.
- Hacer clic en “Spectra”.

- En “Experiment Type”, seleccionar “emission”.
- Cargar un nuevo “experiment file” llamado “Emission check 25.xml”.
- La configuración debiera ser Ex 350 nm, Em 365-450 nm, Ex y Em “slits” 5 nm.
- Hacer clic en “Detectors” y comprobar que el “integration time” es 0.25 s y que los modos S1/R1 y S1c/R1c estén seleccionados y aparezcan en el cuadro de “formulas”.
- Cambiar el nombre del fichero (en “Data Identifier”) a **M(leg)\_(stn)sMQ\_a** (por ejemplo M1\_001sMQ\_a, para el primer leg, primera estación y primer Raman del día) y así el espectro se guardará como **M(leg)\_(stn)sMQ\_a1**.
- Usando guantes, limpiar las paredes de la cubeta sellada con agua Milli-Q con tisú y colocarla en el portacubetas, con las letras mirando hacia nosotros.
- Hacer clic en “Run” para registrar el espectro.
- Cuando el espectro termine, hacer clic en el pico más alto de ambos modos. El máximo del pico Raman debiera aparecer a **397±1 nm** y la intensidad debiera ser alrededor de 565000 CPS en ambos modos.
- Si el pico Raman está dentro de este rango, calcular el área bajo el pico. Para ello, ir a “Analysis” en el menú principal → “Calculus” → “Integrate”. El área aparecerá en un pequeño recuadro blanco en la esquina inferior derecha de la pantalla. Registrar la altura y área del pico en ambos modos en el fichero “**DAILY fluoroLOG.sxc**” y en el cuaderno de campaña.

### Espectro del bloque de p-terfenilo

- Esta prueba permite comprobar la deriva de la lámpara en la región donde fluorescen los amino ácidos / proteínas aromáticos.
- Hacer clic en “M”.
- Hacer clic en “Spectra”.
- En “Experiment Type”, seleccionar “emission”.
- Cargar un nuevo “experiment file” llamado “Terphenyl check.xml”.
- La configuración debiera ser Ex 295 nm, Em 310-600 nm, Ex y Em “slits” 5 nm.
- Hacer clic en “Detectors” y comprobar que el “integration time” es 0.25 s y que los modos S1/R1 y S1c/R1c estén seleccionados y aparezcan en el cuadro de “formulas”.
- Cambiar el nombre del fichero (en “Data Identifier”) a **M(leg)\_(stn)Tph\_a** (por ejemplo M1\_001Tph\_a, para el primer leg, primera estación) y así el espectro se guardará como **M(leg)\_(stn)Tph\_a1**.
- Usando guantes limpios/nuevos, limpiar las paredes del bloque de p-terfenilo con tisú y colocarlo en el portacubetas, con el número 3 de la parte superior colocado hacia nosotros para que se lea al dere-

cho. A los bloques de terfenilo y terbutadieno debe darles la luz lo menos posible.

- Hacer clic en “Run” para registrar el espectro.
- Cuando el espectro termine, hacer clic en el pico más alto de ambos modos. El máximo del pico de p-terfenilo debiera aparecer a  $338 \pm 1$  nm y la intensidad debiera ser alrededor de  $3.8 \cdot 10^7$  CPS en modo S1/R1 y  $6.5 \cdot 10^7$  CPs en modo S1c/R1c en ambos modos.
- Si el pico de p-terfenilo está dentro de este rango, calcular el área bajo el pico. Para ello, ir a “Analysis” en el menú principal, luego a “Calculus” y luego a “Integrate”. El área aparecerá en un pequeño recuadro blanco en la esquina inferior derecha de la pantalla. Registrar la altura y área del pico en ambos modos en el fichero “DAILY fluoroLOG.sxc” y en el cuaderno de campaña.

### Espectro del bloque de p-tetrafenilbutadieno

- Esta prueba permite comprobar la deriva de la lámpara en la región donde fluorescen las sustancias húmicas.
- Hacer clic en “M”.
- Hacer clic en “Spectra”.
- En “Experiment Type”, seleccionar “emission”.
- Cargar un nuevo “experiment file” llamado “TPButadiene check.xml”.
- La configuración debiera ser Ex 348 nm, Em 365-600 nm, Ex y Em “slits” 5 nm.
- Hacer clic en “Detectors” y comprobar que el “integration time” es 0.25 s y que los modos S1/R1 y S1c/R1c estén seleccionados y aparezcan en el cuadro de “formulas”.
- Cambiar el nombre del fichero (en “Data Identifier”) a **M(leg)\_(stn)But\_a** (por ejemplo M1\_001But\_a, para el primer leg, primera estación) y así el espectro se guardará como **M(leg)\_(stn)But\_a1**.
- Limpiar las paredes del p-terfenilo y colocarlo en el portacubetas, con el número 4 de la parte superior colocado hacia nosotros para que se lea al derecho.
- Hacer clic en “Run” para registrar el espectro.
- Cuando el espectro termine, hacer clic en el pico más alto de ambos modos. El máximo del pico de p-tetrafenilbutadieno debiera aparecer a  $422 \pm 1$  nm y la intensidad debiera ser alrededor de  $2.5 \cdot 10^7$  CPS en ambos modos.
- Si el pico de p-tetrafenilbutadieno está dentro de este rango, calcular el área bajo el pico. Para ello, ir a “Analysis” en el menú principal, luego a “Calculus” y luego a “Integrate”. El área aparecerá en un pequeño recuadro blanco en la esquina inferior derecha de la pantalla. Registrar la altura y área del pico en ambos modos en el fichero “DAILY fluoroLOG.sxc” y en el cuaderno de campaña.



### ● Comprobación de contaminación en la cubeta

- Con los guantes de vinilo o polipropileno puestos, enjuagar (3 veces) y llenar la cubeta de cuarzo con agua Milli-Q recién producida, evitando el desarrollo de burbujas.
- Secar las paredes exteriores de la cubeta con tisús.
- Insertar la cubeta en el portacubetas y cerrar bien la cámara de muestra. Colocar la cubeta siempre en la misma posición, con las letras hacia delante.
- Hacer clic en “M”.
- Hacer clic en “Spectra”.
- En “Experiment Type”, seleccionar “emission”.
- Cargar (*load*) un nuevo “experiment file” llamado “contam.xml”.
- La configuración debiera ser Em 270–430 nm, Ex 240 nm, Ex y Em “slits” 5 nm y “integration time” 0.1 s.
- Hacer clic en “Run” para realizar el espectro.
- Este espectro se grabará como “contam1”.
- Se pueden hacer espectros adicionales seleccionando el botón justo a la derecha de “M”. En ese caso, los espectros adicionales se grabarán con los nombres contam2, contam3, etc.
- El espectro resultante debiera ser una línea plana con ruido y tener una intensidad muy baja (<2000 CPS). Si se ve algún pico, aunque sea con mucho ruido, debe lavarse de nuevo la cubeta y llenarse con Milli-Q recién preparada.
- Registrar el máximo valor de intensidad entre 300nm y 350 nm en la columna “contaminación?” del fichero “DAILY fluoroLOG.sxc” y en el cuaderno de campaña; en estas longitudes de onda es donde los amino ácidos/proteínas fluorescen, por eso no debiera observarse ningún pico en el agua Milli-Q.
- Si después de repetidos lavados el pico sigue apareciendo, probar a rotar la cubeta 90° y medir de nuevo. Cualquier cambio en la intensidad o posición del pico nos indica que alguna de las paredes de la cubeta sigue estando sucia. En ese caso, será necesario limpiar la cubeta con metanol (ver el apartado de “Notas” más abajo).

### ● Calibración RAMAN

#### Espectro Raman de la cubeta de medida con agua Milli-Q

- Se realiza sin retirar la cubeta con Milli-Q, después de conseguir un espectro sin contaminación. El área bajo el pico Raman se usará para normalizar las medidas realizadas.
- Hacer clic en “M”.
- Hacer clic en “Spectra”.
- En “Experiment Type”, seleccionar “emission”.
- Cargar un nuevo “experiment file” llamado “Emission check 25.xml”.

- La configuración debiera ser Ex 350 nm, Em 365-450 nm, Ex y Em “slits” 5 nm.
- Hacer clic en “Detectors” y comprobar que el “integration time” es 0.25 s y que los modos S1/R1 y S1c/R1c estén seleccionados y aparezcan en el cuadro de “formulas”.
- Cambiar el nombre del fichero (en “Data Identifier”) a **M(leg)\_(stn)raman\_a** (por ejemplo M1\_001raman\_a, para el primer leg, primera estación y primer Raman del día) y así el espectro se guardará como **M(leg)\_(stn)raman\_a1**.
- Hacer clic en “Run” para registrar el espectro.
- Cuando el espectro termine, hacer clic en el pico más alto de ambos modos. El máximo del pico Raman debiera aparecer a  $397 \pm 1$  nm y la intensidad debiera ser alrededor de 555000 CPS en ambos modos.
- Si el pico Raman está dentro de este rango, calcular el área bajo el pico. Para ello, ir a “Analysis” en el menú principal, luego a “Calculus” y luego a “Integrate”. El área aparecerá en un pequeño recuadro blanco en la esquina inferior derecha de la pantalla. Registrar la altura y área del pico en ambos modos en el fichero “**DAILY fluoro-LOG.sxc**” y en el cuaderno de campaña.

Al final de la tanda de análisis, repetir el espectro de emisión de la cubeta sellada de agua Milli-Q entre 365 nm y 450 nm excitando a 350 nm.

## Descripción de la técnica

### *Recogida de muestras para la determinación de la absorbancia y fluorescencia*

- Ponerse guantes de vinilo.
- Tomar las muestras directamente de la botella Niskin en frascos de vidrio de 250 ml. Enjuagar tres veces con la misma agua de muestreo y recoger aprox. 200 ml de agua.
- Almacenar las muestras en la oscuridad, en un lugar fresco y alejado de compuestos orgánicos volátiles hasta el momento de medir su fluorescencia y absorbancia. Debe esperarse a que la temperatura de las muestras se equilibre con la del laboratorio antes de comenzar a medir. Las medidas deben hacerse en < 2 horas desde que se recojan las muestras.
- Una vez que la absorbancia y fluorescencia de las muestras se ha medido, lavar los frascos de vidrio de 250 ml con agua Milli-Q (3 lavados sucesivos con 25 ml). Cada 3 días, sumergir los frascos en 1% HCl durante 24 horas y lavarlos con agua Milli-Q abundante (3 lavados sucesivos con 25 ml de Milli-Q). Renovar el ácido 1% HCl al cabo de 5 lavados, es decir, cada 15 días.

### *Filtración de muestras para la determinación de la absorbancia y fluorescencia*

Las muestras de la roseta superficial han de filtrarse previamente. En el caso del bloque de biogeoquímica se hará a través de filtros GF/F de 47 mm en un sistema de filtración de vidrio bajo presión controlada de N<sub>2</sub> ultrapuro. Para ello:

- Ponerse guantes de vinilo.
- Colocar un filtro GF/F en el porta filtros (usar un filtro por estación) y añadir 50 ml de agua Milli-Q para lavar el filtro, fijando la presión de manómetro en 0.5 bares y el flujo del flujómetro en 50 ml min<sup>-1</sup>.
- Añadir 50 ml de muestra para lavar el sistema de filtración y el filtro.
- Añadir otros 50 ml de muestra, recoger el filtrado directamente en las cubetas de fluorescencia y absorbancia, y proceder a su determinación.

Este proceso se repetirá para las muestras de la roseta superficial, comenzando por la de mayor profundidad y terminado por la más superficial.

Una vez finalizada la filtración, lavar el sistema de filtración de vidrio con agua Milli-Q (3 lavados sucesivos con 25 ml). Cada 3 días, sumergir los frascos en 1% HCl durante 24 horas y lavarlos con agua Milli-Q abundante (3 lavados sucesivos con 25 ml de Milli-Q). Renovar el ácido 1% HCl al cabo de 5 lavados, es decir, cada 15 días.

En el caso del bloque de fitoplancton (5) lo hará a través de filtros Millex de 0.2 µm de tamaño de poro por medio de una jeringa. Para ello:

- Ponerse guantes de vinilo.
- Colocar un filtro Millex en la jeringa. Usar un filtro por estación como mínimo y cambiar el filtro siempre que haya que ejercer una presión extra debido a la acumulación de materia en el filtro. Lavar la jeringuilla y el filtro previamente con 40 ml de agua Milli-Q (2 x volumen jeringa).
- Lavar el sistema de filtración y el filtro con 20 ml de agua de la muestra.
- Añadir otros 20 ml de muestra, recoger el filtrado directamente en las cubetas de absorbancia, y proceder a su determinación.

### *Determinación a bordo de la absorbancia*

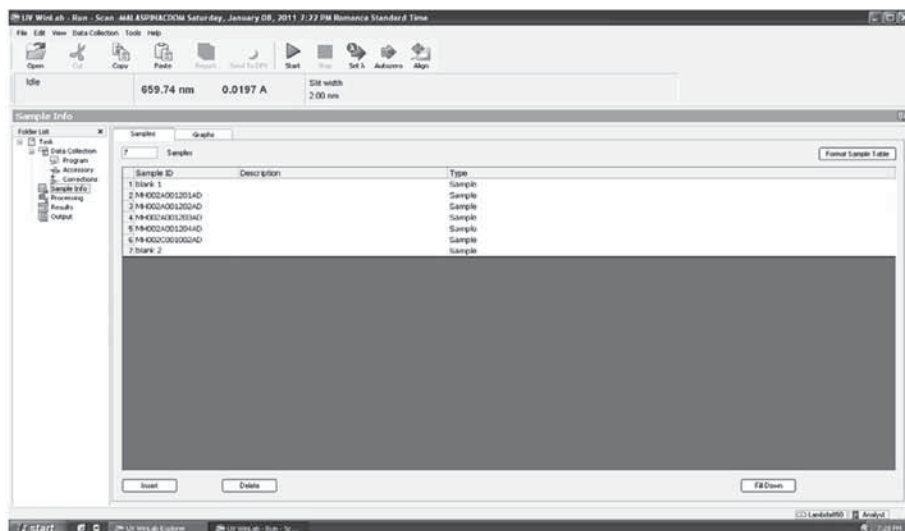
● Encender el espectrofotómetro aproximadamente media hora antes de comenzar a hacer las medidas. Para ello:

- Presionar el botón situado en la esquina posterior derecha de la cubierta del aparato.
- Esperar 1 minuto.



Comprobar que en la esquina superior izquierda aparece el mensaje “Idle” que indica que todo está correcto.

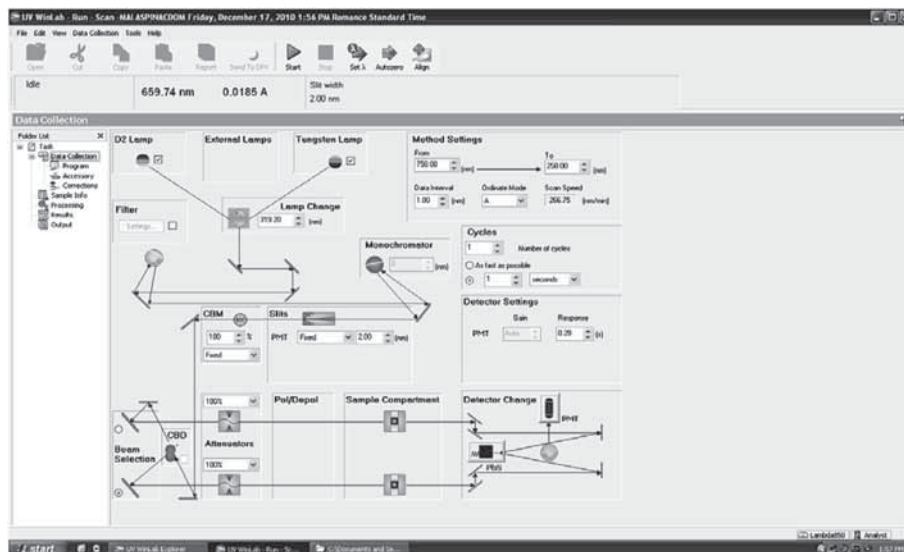
- En la pestaña “samples” escogemos el nº de muestras correspondientes (en la mayoría de los casos son 7 muestras si se trata del CTD de 200 m y 11 si se trata del CTD de 4000 m) y las nombramos con la nomenclatura oficial de la expedición MALASPINA 2010 correspondiente a cada bloque. Por ejemplo, el código MH002A001201AD correspondería a una muestra tomada en la expedición MALASPINA (M), a bordo del *BIO Hespérides* (H), el segundo día de campaña (002), de una botella Niskin de la roseta (A), en la primera estación (001), en la segunda tirada de la roseta (2), de la botella nº 1 (1) para medir absorbancia disuelta (AD). La siguiente ventana correspondería al caso del CTD de 200 m:



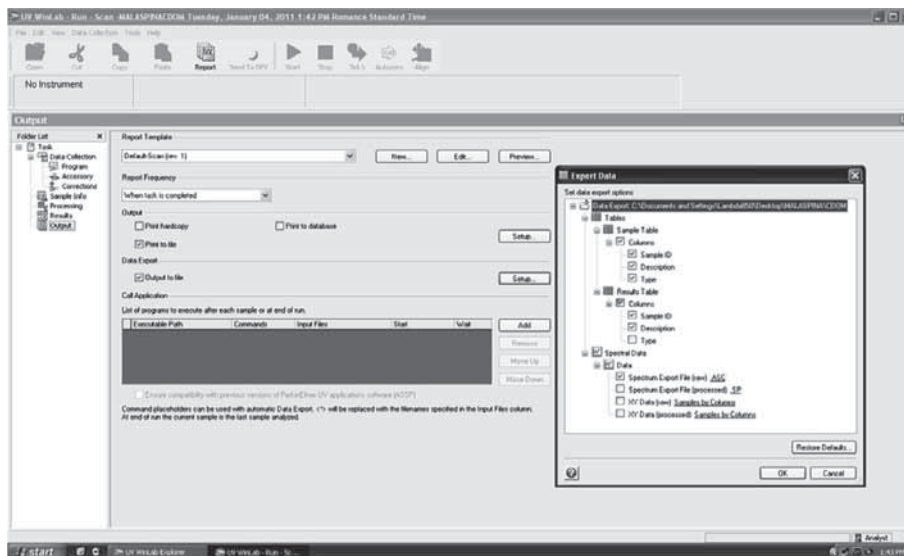
En este caso, se han programado 7 scans (5 muestras más 1 Milli-Q al inicio y otro al final). Para la roseta profunda se programarán 11 scans (8 muestras, 1 Milli-Q inicial, 1 Milli-Q intermedio y un Milli-Q final).

En el caso del bloque 3 se usará la misma nomenclatura añadiendo al final el dígito “\_B3” que indica el bloque del que se trata. Por ejemplo, MH002A001201AD\_B3) para la misma muestra que en el ejemplo del bloque 5. El primer botellón de la mañana se nombrará como MH002C001001AD\_B3, donde “C” hace referencia al botellón y “001” a que se trata del primer lance de botellones del día.

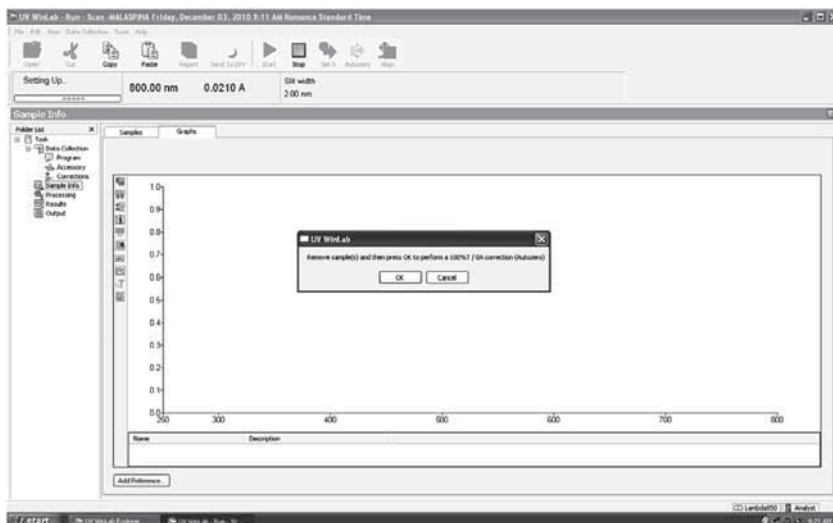
El método ya está preconfigurado, pero si queremos comprobarlo se pincha en el enlace “Data Collection” de la columna de la izquierda y aparecerá la siguiente pantalla con la configuración de las lámparas y los valores adecuados para recoger el espectro de la CDOM.



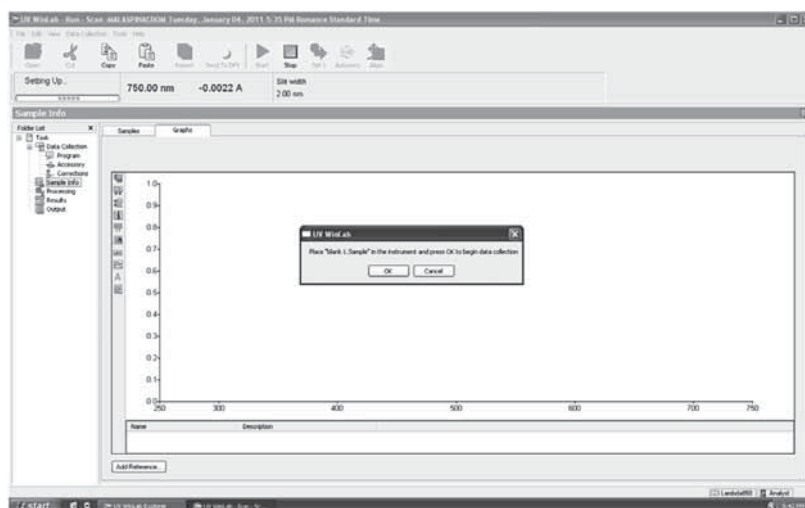
Además, en el enlace “Output” hemos configurado el directorio en el que se grabarán los datos, que será MALASPINA/CDOM en el escritorio del PC, así como el formato de los ficheros de datos que será ASCII). La correspondiente pantalla es la siguiente:



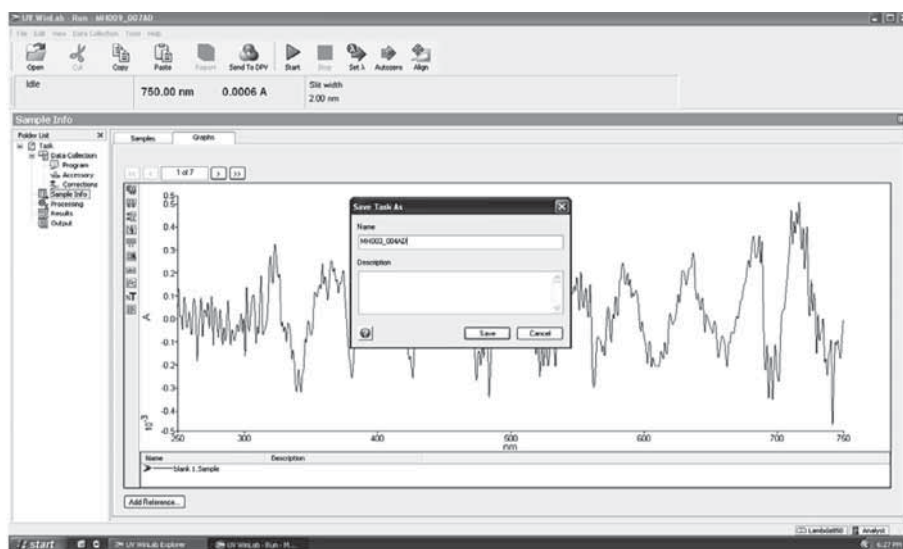
- Presionar el botón “Start” en la parte superior de la pantalla y aparecerá la siguiente pantalla:



- Ponerse guantes de vinilo.
- Llenar la cubeta de referencia con agua Milli-Q recién producida evitando el desarrollo de burbujas. Secar completamente las paredes de la cubeta con tisú y colocarla en el portacubetas de referencia.
- Llenar la cubeta de medida con agua Milli-Q recién producida evitando el desarrollo de burbujas. Tener cuidado de colocar la cubeta en la misma posición siempre que hagamos una medida. Secar completamente las paredes de la cubeta con tisú y colocarla en el portacubetas de medida. Finalmente, hacer clic en "Ok" para hacer el autozero (100% T). Tras hacer el espectro del autozero, aparecerá la siguiente pantalla:



- Sin cambiar el agua Milli-Q de la cubeta de medida, hacer clic en “Ok” para registrar el primer blanco de Milli-Q, que se grabará con el nombre de archivo “blank 1”
- Enjuagar la cubeta de medida tres veces con agua de muestra y llenarla evitando el desarrollo de burbujas (tomando el agua del sistema de filtración en caso de que se trate de una muestra de la roseta superficial o directamente del frasco de vidrio de 250 l en caso de que se trate de una muestra profunda). Tener cuidado de colocar la cubeta en el espectrofotómetro en la misma posición siempre que hagamos una medida. Secar completamente las paredes de la cubeta con tisú y colocarla en el portacubetas de medida. Realizar el espectro (el primero será por ej.: “MH002A001201AD”, el siguiente “MH002A001202AD” y así sucesivamente) y grabarlo en formato ASCII (predeterminado). Abrir un directorio por estación y anotar en la libreta y el estadillo la equivalencia entre los diferentes códigos y las muestras.
- Finalizado el proceso de análisis procedemos a guardar los resultados. Para ello pinchamos **FILE\ SAVE RESULTS\ AS NEW TASK...** y aparecerá la siguiente pantalla:



Para las medidas del bloque de fitoplancton, nombramos el directorio de resultados según la nomenclatura oficial de la expedición MALASPINA en donde viene reflejado el código de la campaña (M, de MALASPINA), el buque (H, de *BIO Hespérides*) el día de campaña (tres dígitos), la estación (3 dígitos) y la variable medida (AD para absorbancia disuelta y AP para absorbancia particulada). Por ejemplo, MH003\_002AD para las medidas de



absorbancia disuelta (AD) de la estación nº 2 (002), que se realizó el tercer día de campaña (003) de la expedición MALASPINA (M) a bordo del *BIO Hespérides*.

Para las medidas del bloque de bioquímica, se usará la misma nomenclatura indicando a mayores si se trata del primer CTD del día (01, roseta profunda) o del segundo (02, roseta superficial). Por tanto, se generarán dos directorios: MH003\_002AD\_B301 y MH003\_002AD\_B302.

En cualquier caso, en cada directorio aparecerá un archivo por espectro en formato ASCII.

- Al terminar la secuencia de análisis, sumergir las cubetas de 10 cm en 1% HCl durante al menos 2 horas y lavarlas con agua Milli-Q abundante (3 lavados sucesivos con 25 ml de Milli-Q) antes de usarlas de nuevo.

### *Determinación a bordo de la fluorescencia*

#### i) Matrices

Las matrices de excitación-emisión consisten en 22 espectros de emisión concatenados, empezando a una longitud de onda de excitación de 240 nm y terminado a 450 nm (es decir separados en 10 nm) y leyendo la intensidad de emisión entre 300 y 560 nm a intervalos de 2 nm.

#### ● Espectros 3-Dimensionales (EEMs) – blancos

- Cada EEMs lleva unos 20 minutos.
- **Nota: cada día hay que hacer una EEM de agua Milli-Q recién preparada que luego se sustraerá a cada muestra.** Tanto el blanco como las muestras deben generarse usando el mismo “experiment file”.
- Hacer clic en “M”.
- Hacer clic en “3D”.
- Cargar un nuevo “experiment file” llamado “EEMnew25.xlm”.
- Comprobar que la configuración es Ex 240–450 a intervalos de 10 nm, Em 300–560 nm a intervalos de 2 nm, Ex y Em “slits” a 5 nm, y no “Rayleigh masking checked”.
- Hacer clic en “Detectors” y asegurarse de que el tiempo de integración es 0,25 s y que ambos modos S1/R1 y S1c/R1c están seleccionados y aparecen en el cuadro de “formulas”.
- Cambiar el nombre del fichero (en “Data Identifier”) a uno del tipo **M(leg)\_(stn)blank\_a**, por ejemplo el primero sería M1\_001blank\_a. La letra final (a, b, c...) se utiliza para diferenciar los distintos blancos hechos en una misma estación.
- Hacer clic en “Run” para iniciar la EEM.
- Para el ejemplo, las EEM se grabarán como “M1\_001blank\_a1\_S1R1” (sin corregir) y “M1\_001blank\_a2\_S1cR1c” (corregida) y los ficheros

con los datos se grabarán con los nombres “M1\_001blank\_ad1” y “M1\_001blank\_ad2” (pueden encontrarse en la lista de ficheros si se hace doble clic en “data”).

### ● Espectros 3-Dimensionales (EEMs) - muestras

- Enjuagar la cubeta de 1 cm tres veces con agua de muestra y llenarla evitando el desarrollo de burbujas (tomando el agua del sistema de filtración en caso de que se trate de una muestra de la roseta superficial o directamente del frasco de vidrio de 250 l en caso de que se trate de una muestra profunda).
- Hacer clic en el botón justo a la derecha de “M” (es el dibujo de un espectro) y se llama “Previous experiment setup”.
- Así se cargará el mismo “experiment file”, es decir, “EEMnew25.xlm”.
- No cambiar la configuración, EXCEPTO en el cuadro “Data Identifier” donde debe escribirse el nombre de la muestra: **M(leg)(stn)(cast)(bottle)**, donde leg = 1 a 7, stn = 001 a 177, cast = s (superficie) o d (“deep”, profundo), y bottle = 01 a 24. Por ejemplo, la primera muestra sería M1\_001s01 y la última: M7\_177d24. Las muestras del primer botellón de la mañana se nombran como **M(leg)(stn)sB**.
- Hacer clic en “Run” para empezar la EEM.

### ● Grabación de datos

- Grabar el proyecto haciendo clic en “File” y después en “Save Project”.
- Grabar el proyecto seleccionando “File” en el menú principal y “Save Project as” de la barra. Grabar el proyecto en un nuevo directorio “MALASPINA” con la misma fecha que el proyecto (habrá que crear una nueva carpeta). Por ejemplo, para las muestras corregidas el 4–Nov–2008, grabar el proyecto en el directorio.  
C:\Program Files\Jobin Yvon\Data\MALASPINA\081104\.

### ● Exportar datos

- Para exportar los ficheros en ascii, ir al menú principal y seleccionar “File”.
- Seleccionar “Batch Export” y “ASCII Data” de menú.
- Seleccionar todos los ficheros a exportar y hacer clic en “Export Data”.
- Elegir la carpeta donde grabar los ficheros exportados.
- Para el proyecto MALASPINA, grabarlos en una nueva carpeta dentro del directorio MALASPINA con la misma fecha que el proyecto y en un subdirectorio llamado “ascii” (p.e. para las muestras medidas el 4–Nov–2008, grabar en:  
C:\Program Files\JobinYvon\Data\MALASPINA\081104\ascii\)

- **Corrección de los picos Rayleigh de primer y segundo orden:** se hace posteriormente en MATLAB.
- **Corrección de “inner-filter” de las EEM:** se hace posteriormente en MATLAB.
- **Normalización al pico Raman de las EEM:** se hace posteriormente en MATLAB.
- **Substracción del blanco de agua Milli-Q de las EEM:** se hace posteriormente en MATLAB.

Al terminar la secuencia de análisis, sumergir la cubeta de 1 cm en 1% HCl durante al menos 2 horas y lavarla con agua Milli-Q abundante (3 lavados sucesivos con 5 ml de Milli-Q) antes de usarla de nuevo. Si la cubeta sigue sucia, lavarla con metanol (3 lavados sucesivos con 5 ml) y después con agua Milli-Q abundante (3 lavados sucesivos con 5 ml de Milli-Q).

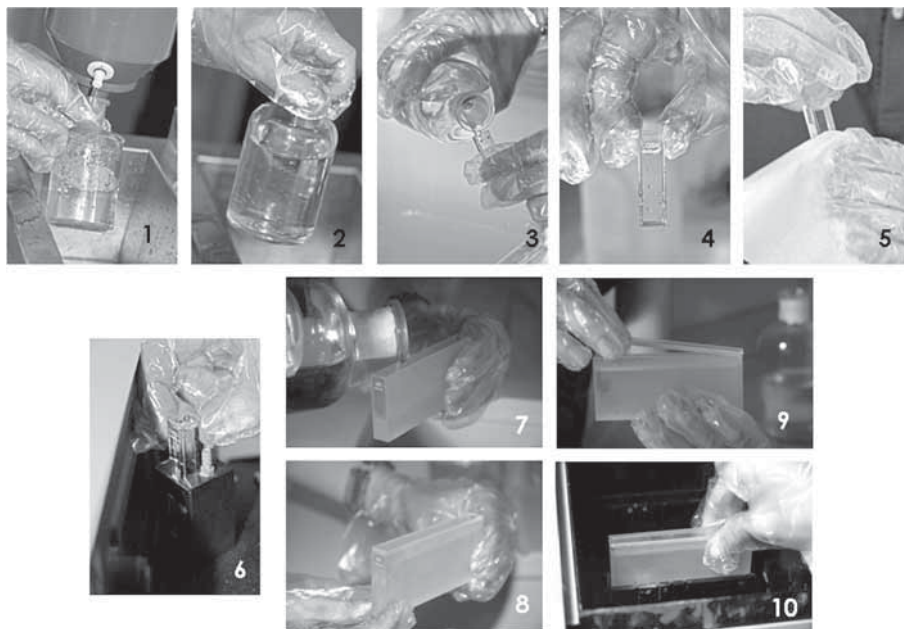
**ii) Apagado del instrumento** (se apagará siempre que el instrumento vaya a estar más de 2 horas inactivo).

- Hacer clic en “X” en la parte derecha superior de la pantalla para salir del programa.
- Asegurarse de que se ha introducido toda la información necesaria en el fichero “DAILY fluorOLOG.sxc” y en la libreta de campaña.
- 1º – apagar el ordenador.
- 2º – apagar el fluorímetro y cubrirlo con plástico.
- NO REINICIAR NUNCA EL FLUORÍMETRO JUSTO DESPUÉS DE APAGARLO. DEBE DEJARSE QUE LA LÁMPARA SE ENFRÍE DURANTE AL MENOS 1 HORA ANTES DE ENCENDERLO DE NUEVO.
- Lavar la cubeta con agua Milli-Q. Dejarla secar unos minutos. Colocarla en su estuche.

### **iii) Notas/Correcciones/actualizaciones**

- **Lavado de la cubeta.**
  - Normalmente la cubeta se limpia únicamente con agua Milli-Q o con 1% HCl y luego Milli-Q. Si este procedimiento no es suficiente, entonces puede lavarse con metanol y luego con Milli-Q. Si la cubeta sigue sucia, puede probarse disolviendo 2 lentejas de NaOH en 200 ml de metanol y sumergir la cubeta en esa disolución durante 2 horas. Después, enjuagar abundantemente con agua Milli-Q (>10 veces).
- **Enjuagado de la cubeta entre muestras.**
  - Entre muestras, enjuagar la cubeta 2 veces con agua Milli-Q y luego otras 2 veces con la muestra.
- **Nomenclatura de las muestras.**
  - Nombres menores de 5 caracteres darán un error.

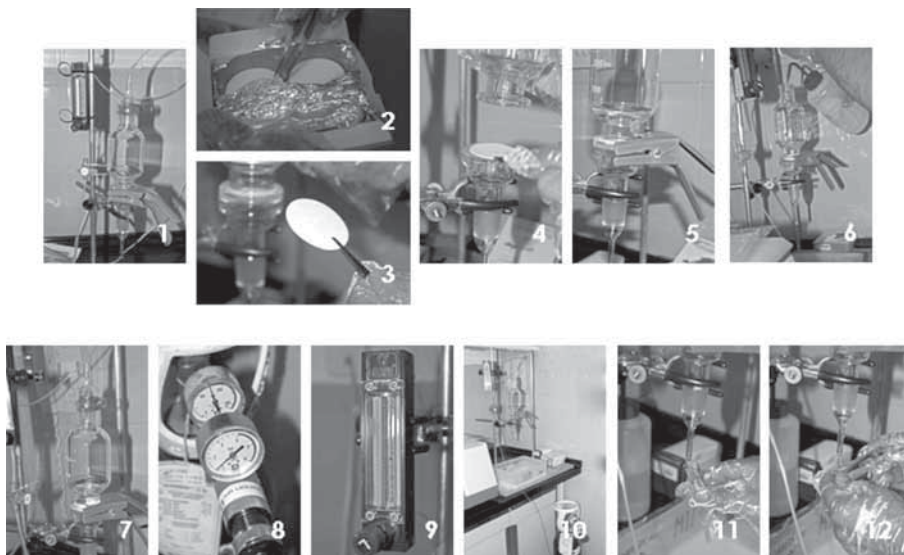
### Cuadro sinóptico de la técnica



Se presenta una secuencia de fotografías numerada que muestra los pasos más relevantes del proceso de recogida, filtrado y análisis a bordo de la absorbancia (aDOM) y fluorescencia (FDOM) de muestras de materia orgánica total cromófora. (1) y (2) recogida de la muestra en frascos de vidrio de 250 ml directamente de la botella; (3) y (4) enjuague y llenado de la cubeta de cuarzo de 1 cm para la medida de la fluorescencia; (5) secado de la cubeta de 1 cm; (6) colocación en el portacubetas del espectrofluorímetro; (7) y (8) enjuague y llenado de la cubeta de 10 cm con paredes de cuarzo para la medida de la absorbancia; (9) y (10) colocación en el portacubetas del espectrofotómetro.

En caso de tratarse de una muestra de agua superficial, después del paso (2), hay que proceder al filtrado de la muestra, tal y como se recoge en la siguiente secuencia de fotografías. (1) sistema de filtración de material disuelto que se utilizará; (2) y (3) filtros GF/F de 47 mm calcinados que se colocarán en el sistema con la cara menos rugosa hacia arriba con una pinza Millipore; (4) y (5) colocación del filtro en el sistema y cierre del mismo con una pinza de sujeción Millipore; (6) y (7) se añaden 50 ml de agua Milli-Q para lavar el filtro y se coloca el tapón superior con la pinza de sujeción que se muestra; (8) y (9) se abren las llaves de la bombona de aire sintético y del manómetro, luego la llave que conecta con flujómetro y en este se fija la presión alrededor de  $50 \text{ ml min}^{-1}$ ; (10) se vacía el sistema

en la bandeja que hay debajo del sistema; (11 y 12) se añade la muestra de igual manera que se hizo con el agua Milli-Q, enjuagando previamente el sistema de cada vez con 50 ml de muestra, y recogiendo luego el filtrado para medir la fluorescencia y la absorbancia, lavando dos veces cada cubeta. A continuación se miden las muestras como se explicó anteriormente.



## Cálculo de los resultados

### *Absorbancia*

Se calculará el coeficiente de absorción a cada longitud de onda,  $a(\lambda)$ , aplicando la siguiente ecuación:

$$a(\lambda) = 23.03 \cdot [\text{ABS}(\lambda) - \text{ABS}(600-750)]$$

Donde  $\text{ABS}(\lambda)$  y  $\text{ABS}(600-750)$  son las absorbancias a las longitudes de onda  $\lambda$  y promedio entre 600 y 750 nm, respectivamente.

Se obtendrá la pendiente espectral,  $S$ , como la pendiente de la regresión lineal entre  $\ln[a(\lambda)]$  y  $\lambda$  para longitudes de onda entre 250 y 500 nm. El valor de  $S$  se acompañará del error estándar de la estimación (E.E.).

### *Fluorescencia*

Las matrices de excitación-emisión se expresarán en unidades Raman dividiendo la intensidad de fluorescencia entre el área bajo el pico Raman (ver apartado de calibrado).

## Control de calidad

### *Absorbancia*

- Al principio, mitad y final de cada sesión de análisis se hará un espectro del agua Milli-Q para comprobar la deriva del espectrofotómetro.

### *Fluorescencia*

- Diariamente se calibrará el espectrofluorímetro en unidades Raman, registrando un espectro de emisión de: (1) el patrón de referencia de agua Milli-Q entre 365 nm y 450 nm excitando a 350 nm; (2) el patrón de referencia de p-terfenilo entre 310 nm y 600 nm excitando a 295 nm; y (3) el patrón de referencia de tetrafenilbutadieno entre 365 nm y 600 nm excitando a 348 nm, fijando el ancho de ranura de excitación y emisión en 5 nm y el tiempo de integración en 0.25 segundos para comprobar, y en caso necesario, corregir la deriva del aparato.

## Referencias

LAWAETZ, A. J., C. A. STEDMON. 2009. «Fluorescence intensity calibration using the Raman scatter peak of water». *App. Spectroscop.* 63: 936-9.

# Determinación del consumo de $^{15}\text{NO}_3^-$ , $^{15}\text{NH}_4^+$ , $^{15}\text{N}$ -urea y fijación de $^{15}\text{N}_2$

Ramírez, T.; Gago, J.

*Instituto Español de Oceanografía*

## Finalidad. Campo de aplicación

Obtención de muestras de agua de mar para realización de incubaciones a bordo del buque con el objeto de medir simultáneamente la producción nueva, la producción regenerada y las tasas de fijación de  $\text{N}_2$  a diferentes profundidades.

## Conceptos generales

Generalmente se acepta que en el océano global el N es el elemento nutriente que más frecuentemente limita la producción primaria. Aunque el  $\text{NO}_3^-$  es la especie dominante de N inorgánico en muchas regiones oceánicas, gran parte de la producción primaria en el océano es debida al consumo por el fitoplancton de formas de N reciclado (amonio, urea y amino ácidos). La producción primaria nueva depende de la llegada de nutrientes nuevos a la capa fótica a través de procesos de difusión turbulenta, afloramientos, aportes de los ríos, deposición atmosférica o fijación de  $\text{N}_2$ . Por el contrario, la producción primaria regenerada se debe al consumo por el fitoplancton de nutrientes que son reciclados en la capa fótica a través de las redes tróficas heterotróficas.

La capacidad del océano para secuestrar  $\text{CO}_2$  atmosférico viene en gran medida determinada por la producción nueva, definida como la fracción de la producción primaria soportada por la entrada de nutrientes nuevos (habitualmente nitrato) en la zona eufótica (Eppley y Peterson, 1979; Dug-

dale y Goering, 1967). En el océano la producción nueva y, consecuentemente la exportación de C por la bomba biológica se incrementa en regiones donde tienen lugar mezcla turbulenta y el afloramiento de aguas profundas, debido al aporte de nutrientes nuevos a la zona fótica. Debido precisamente al papel regular que el océano juega sobre el clima, en las últimas décadas se ha realizado por parte de la comunidad científica un gran esfuerzo para cuantificar de forma global la producción nueva y regenerada en el océano. La determinación de la f-ratio, la proporción entre producción nueva y la producción total, permiten hacer estimaciones de la proporción de la producción biológica que es exportada hacia el fondo del océano en forma de materia orgánica particulada.

La producción nueva y la producción regenerada en la zona fótica pueden estimarse midiendo el consumo por el fitoplancton de diferentes formas de N disuelto. En concreto la producción nueva se mide añadiendo concentraciones traza de  $^{15}\text{NO}_3^-$  (<10% de la concentración inicial de  $\text{NO}_3^-$  presente en la muestra de agua de mar) a una muestra de agua de mar. Una vez adicionado el  $^{15}\text{NO}_3^-$ , las muestras son incubadas, usando botellas transparentes de policarbonato, en determinadas condiciones de luminosidad y temperatura durante un periodo de tiempo determinado, tras el cual las incubaciones son finalizadas y las muestras de agua de mar filtradas. La concentración de  $^{15}\text{N}$  en el filtro permitirá estimar el consumo de  $^{15}\text{NO}_3^-$  y determinar el valor de la producción nueva. La determinación de la producción regenerada se basa en las medidas del consumo de  $^{15}\text{NH}_4^+$  y  $^{15}\text{N}$ -urea (Dugdale y Goering, 1967) en las mismas condiciones que las empleadas para medir el consumo de  $^{15}\text{NO}_3^-$ .

Por otra parte, la fijación de  $\text{N}_2$  atmosférico en el océano es un proceso clave del ciclo biogeoquímico del N y contribuye de forma importante a la producción nueva y a la capacidad del océano para el secuestro de C. Hasta hace no mucho se pensaba que este proceso solo era de relevancia en regiones oceánicas ultraoligotróficas, donde las formas disueltas de N (inorgánicas y orgánicas) son muy escasas y donde abundan los microorganismos diazotófos. Sin embargo, se ha visto que la fijación de  $\text{N}_2$  atmosférico parece ser más frecuente y estaría más extendida en el océano de lo que se pensaba en principio. Para poder entender mejor la importancia de la fijación de nitrógeno, su extensión y distribución en el océano global, durante el transcurso de la Expedición Malaspina 2010 se llevarán a cabo ensayos para cuantificar la magnitud de este proceso en los diferentes océanos y regiones oceánicas. La estimación de la fijación de  $\text{N}_2$  se realizará basándose en el método de Montoya et ál. (1996), realizando para ello incubaciones de agua de mar en botellas de policarbonato a las que se le inyectará un volumen de  $^{15}\text{N}_2$ . Posteriormente se medirá la cantidad de  $^{15}\text{N}$  que ha sido fijado por el fitoplancton durante el tiempo de incubación, lo que permitirá estimar las tasas de fijación de  $\text{N}_2$  a diferentes profundidades.



## Equipamiento necesario

Espectrómetro de masas, congelador, nevera, nevera portátil, rampas de filtración y soportes para las botellas, bombas de vacío, estufa de desecación.

## Reactivos u otro material fungible

### *Material fungible:*

Guantes desechables, botes desechables de plástico 20 ml, 10 ml y 5 ml; gradillas de plástico; botellas de policarbonato transparente de 2 y 4 l calibradas y con cierre hermético; botellas de policarbonato de 4 l con tapones provistos de septa; micropipetas de volumen variable de 100-200  $\mu\text{L}$ , 100-1000  $\mu\text{L}$ , 1000-5000  $\mu\text{L}$ ; puntas para micropipetas; jeringas Hamilton gastight de 10 ml; jeringas desechables de plástico de 10, 20 y 60 ml; agujas hipodérmicas; 4 incubadores de 180 litros (cajas de plástico opacas); mangueras y conexiones para mangueras; filtros de densidad neutra; embudos de plástico; tubos de silicona; T de plástico; septas de silicona; válvulas de plástico; bolsas de muestreo de gases con válvula; termómetro digital; ácido clorhídrico diluido (10%); parafilm; vasos de precipitado de plástico de diferente capacidad; probetas de plástico de diferentes volúmenes; filtros de fibra de vidrio Whatman GF/F de 25 mm de diámetro precalcinados a 450 °C durante 4 h; pinzas; viales herméticos de 3 ml; gradillas para viales; gafas protectoras.

### *Reactivos:*

$\text{K}^{15}\text{NO}_3$ ,  $(^{15}\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ,  $^{15}\text{N}$ -urea, cilindro de  $^{15}\text{N}_2$  y agua Milli-Q;

## Descripción de la técnica

### Muestreo

Mediante una roseta equipada con botellas Niskin de 10 l se tomarán muestras de 3 profundidades diferentes: 20% PAR, 10% PAR y profundidad del máximo de fluorescencia. De cada una de las profundidades indicadas se recogerán 30 l (3 botellas Niskin de 10 l). Asimismo se tomarán muestras en superficie empleando una botella Niskin de 30 l de capacidad.

Durante los muestreos para las incubaciones con  $^{15}\text{N}$  (fijación de  $\text{N}_2$ , consumo de  $^{15}\text{NO}_3^-$ ,  $^{15}\text{NH}_4^+$  y  $^{15}\text{N}$ -urea) se intentará mantener las muestras, en la medida de lo posible, protegidas de la luz solar directa.

De cada una de las profundidades muestreadas se tomarán muestras para medir nitrato, amonio y urea. Asimismo, empleando botellas de 4 l

(volumen nominal) de policarbonato se tomarán muestras para las incubaciones con  $^{15}\text{N}_2$  y dos réplicas para determinar el contenido inicial en  $^{15}\text{N}$  del nitrógeno orgánico particulado (NOP). Finalmente de cada profundidad se tomarán muestras para las incubaciones con  $^{15}\text{NO}_3^-$  y  $^{15}\text{NH}_4^+$  y  $^{15}\text{N}$ -urea, usando para ello botellas de 2 l (capacidad nominal) de policarbonato. Durante el muestreo deben emplearse guantes desechables limpios. Los botes empleados para el muestro de nutrientes, así como las botellas de policarbonato y el interior de los tapones se lavarán 2 veces con el agua de mar que se muestrea, empleando el menor volumen posible.

Para el análisis de las concentraciones de  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{NH}_4^+$  y urea presentes en el medio se tomarán dos muestras de cada botella. Para el análisis a bordo las muestras se guardarán inmediatamente en nevera. En caso de que no sea posible realizar las determinaciones a bordo las muestras de  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{NH}_4^+$  y urea se congelarán a  $-20\text{ }^\circ\text{C}$  en posición vertical.

### Enriquecimiento inicial en $^{15}\text{N}$ del NOP

La determinación del enriquecimiento inicial en  $^{15}\text{N}$  del NOP es necesaria para poder después realizar los cálculos para las estimaciones de la fijación de  $\text{N}_2$  y del consumo de N.

#### *Muestreo*

Para la determinación del enriquecimiento inicial en  $^{15}\text{N}$  del NOP, de cada una de las profundidades (superficie, 20% PAR, 10% PAR y profundidad del máximo de fluorescencia) se tomarán dos réplicas en botellas de policarbonato de 4 l (capacidad nominal). Las botellas habrán sido calibradas previamente en el laboratorio para conocer su volumen exacto. Las botellas se llenarán hasta la marca señalada en el cuello. El enriquecimiento inicial en  $^{15}\text{N}$  del NOP se utilizará para la estimación de la fijación de  $^{15}\text{N}_2$  y para el cálculo del consumo de  $^{15}\text{NO}_3^-$ ,  $^{15}\text{NH}_4^+$  y  $^{15}\text{N}$ -urea.

#### *Filtración*

Una vez tomadas las muestras se procederá a su filtración para la determinación del enriquecimiento inicial en  $^{15}\text{N}$  del NOP en el agua de mar. El contenido de las botellas se filtrará a baja presión 100-150 mm Hg a través de filtros Whatman GF/F de 2.5 cm de diámetro precalcínados ( $450\text{ }^\circ\text{C}$  durante 4 h). Los filtros serán guardados en viales y secados (en el interior de los viales) a  $60\text{ }^\circ\text{C}$  durante 24h. Transcurrido este tiempo los viales serán cerrados herméticamente y se almacenarán hasta su análisis mediante espectrometría de masas.

Tras finalizar la filtración se procederá a lavar el material empleado (embudos, soportes de los filtros, etc) para su posterior uso para la filtración de las muestras para fijación de  $N_2$ .

### *Precauciones*

Utilizar guantes desechables durante los muestreos y la manipulación de las muestras, guardando siempre la máxima precaución para evitar posible contaminación de las muestras de cualquier tipo de fuente, cambiando de guantes cuando sea necesario. Se procurará no haber estado en contacto antes con disoluciones de  $^{15}NO_3^-$ ,  $^{15}NH_4^+$  o  $^{15}N$ -urea.

Durante la filtración de muestras, para la determinación del contenido inicial en  $^{15}N$  del NOP, material distinto del empleado para las filtraciones de las muestras marcadas con  $^{15}NO_3^-$ ,  $^{15}NH_4^+$  y  $^{15}N$ -urea (diferentes soportes para los filtros, embudos, pinzas, etc.). Por lo que se dispondrá del material separado para tal fin.

### **Fijación de $^{15}N_2$**

#### *Muestreo*

Los experimentos de fijación de nitrógeno se realizarán basándose en la metodología descrita por Montoya et ál. (1996) y modificada por (Zehr et ál., 2001). Las muestras de agua de mar se tomarán en botellas de policarbonato transparentes de 4.0 l de capacidad nominal (calibradas previamente en el laboratorio para conocer su volumen exacto) provistas de tapones con septa de silicona. Las botellas con sus tapones habrán sido previamente lavadas con HCl 10%, seguido de varios lavados con agua Elix y después con Milli-Q (18.2 M $\Omega$ ). Finalmente las botellas serán lavadas un par de veces con unos 200 ml del agua de mar de la profundidad a ensayar.

La muestra de agua se tomará de las botellas Niskin correspondientes, evitando la formación de burbujas. Por ello es conveniente que el flujo de agua desde las botellas Niskin sea lento y que las botellas se llenen inclinandolas, dejando que el agua resbale por las paredes de la botella y evitando así la formación de burbujas. Las botellas se llenarán completamente hasta que estén a punto de desbordar. En este momento reducir el flujo de agua desde la botella Niskin para evitar formación de burbujas. Seguidamente las botellas se colocarán en posición vertical y se dejará fluir el agua lentamente desde la botella Niskin hasta que se forme un menisco convexo en el borde del cuello de la botella. Con la botella en posición vertical, colocar con cuidado el tapón intentando que se mantenga el menisco y cerrar bien la botella. El agua sobrante del menisco desbordará al enroscar el tapón.

Finalmente, una vez que se han cerrado las botellas hay que comprobar que no quedan burbujas de aire en su interior. En caso de que hayan quedado burbujas hay que tratar de eliminarlas. Para lo cual habrá que abrir la botella y añadir el agua necesaria de la muestra para volver a llenar la botella hasta el borde del cuello (como se ha descrito antes), colocándola en posición vertical y repitiendo la operación indicada anteriormente.

### *Adición de sustrato ( $^{15}\text{N}_2$ )*

Una vez que no queden burbujas de aire en las botellas, a cada una de ellas se inyectará 8 ml de  $^{15}\text{N}_2$  (98% átomos) utilizando una jeringa Hamilton Gas-Tight, de forma que el enriquecimiento resultante de  $^{15}\text{N}_2$  sea próximo al 10 % (Capone y Montoya, 2001). El  $^{15}\text{N}_2$  se tomará de una bolsa de muestreo de gases dotada de una válvula. Previamente la bolsa se habrá llenado con  $^{15}\text{N}_2$  de un cilindro a presión, para lo cual se conectará el cilindro a la bolsa de muestreo de gases. La bolsa irá conectada a unos tubos de silicona y una llave de plástico para poder hacer la conexión al cilindro (Figura 1).

El cilindro de gas irá provisto de una válvula principal y de una válvula secundaria, que regulará el flujo de  $^{15}\text{N}_2$ . La unión entre ambas llaves debe hacerse a rosca, empleando las juntas especiales, sin emplear teflón, de forma que la unión sea segura y no haya pérdida posible de gas. La llave secundaria tendrá una salida a la que se pueda conectar un tubo de silicona.

Antes de llenar la bolsa con  $^{15}\text{N}_2$ , tanto la bolsa como los tubos de silicona a los que va conectada deberán primero vaciarse completamente de aire. Para ello se conectará la bolsa a través de los tubos de silicona y llave de plástico a una jeringa de 100 ml, y se succionará el aire contenido. Una vez hecho el vacío, la llave de plástico (conectada a la bolsa a través de los tubos) se cerrará. Se expulsa a continuación el aire aspirado con la jeringa. Seguidamente se volverá a conectar la jeringa al tubo de silicona que va unido a la llave y tras abrir la llave se repetirá la operación anterior las veces necesarias hasta que se haga vacío. Al finalizar la llave de plástico que va conectada a la bolsa se dejará en posición cerrada.

A continuación se conectará el extremo libre del tubo de silicona que va unido a la llave de plástico con el cilindro de  $^{15}\text{N}_2$ . La conexión se realizará a través de una T de plástico a la que se han conectado trozos tubos de silicona para hacer la conexión al cilindro y a la válvula. Al extremo superior de la T se conectará un septa de silicona, de forma que quede bien ajustado (ver Figura 1). Seguidamente con una jeringa de 20 ml a la que se le colocará una aguja hipodérmica se procederá a extraer el aire contenido en los tubos que unen la bolsa con el cilindro (con la llave de plástico conectada a la bolsa en posición cerrada). Pinchando en el septa se extraerá el aire que haya en el interior de la conexión en T. Repetir la operación

hasta que se elimine todo el aire y se haya hecho vacío en interior de los tubos y la T de plástico que conectan la bolsa al cilindro. A continuación se abrirá la llave de plástico de la bolsa. Después se abrirá la válvula principal que regula la salida de  $^{15}\text{N}_2$  del cilindro y finalmente se abrirá lentamente la válvula que regula el flujo, llenándose la bolsa de  $^{15}\text{N}_2$  (Figura 1).

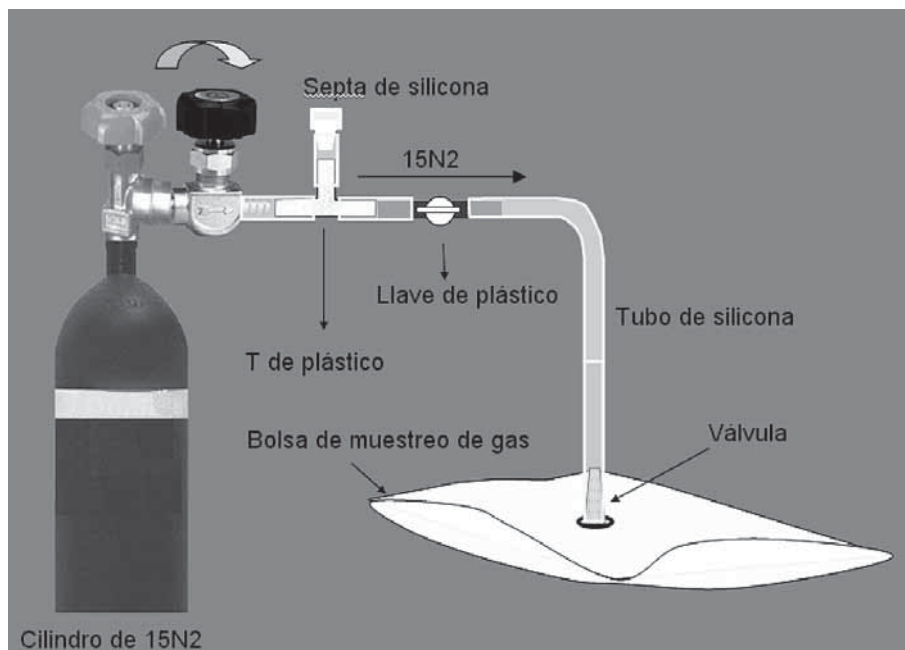


Figura 1. Esquema de conexión entre la bolsa de muestreo de gases y el cilindro de  $^{15}\text{N}_2$ .

La bolsa se llenará con cantidad suficiente de  $^{15}\text{N}_2$  para el muestreo. Si tras el muestreo queda algún  $^{15}\text{N}_2$  remanente en la bolsa, el mismo se podrá utilizar para los experimentos de fijación en las siguientes estaciones. Una vez que se haya llenado la bolsa con una cantidad deseada de  $^{15}\text{N}_2$ , cerrar inmediatamente la llave que regula el flujo de  $^{15}\text{N}_2$  y después cerrar con firmeza la llave principal del cilindro. A continuación cerrar la llave de plástico de la bolsa. Separar la bolsa del cilindro desconectando el extremo del tubo que va unido a la llave de plástico.

A continuación se colocará en el extremo libre de la llave de plástico un pequeño trozo de tubo de silicona, en el extremo del cual se habrá ajustado un septa de silicona (usar guantes en esta operación). Con la llave cerrada y con una jeringa de plástico provista de aguja penetrar el septa de silicona y sacar el aire que queda en el extremo de llave, hasta que se consiga el vacío (ver Figura 2). Retirar la jeringa y abrir la llave de plástico.

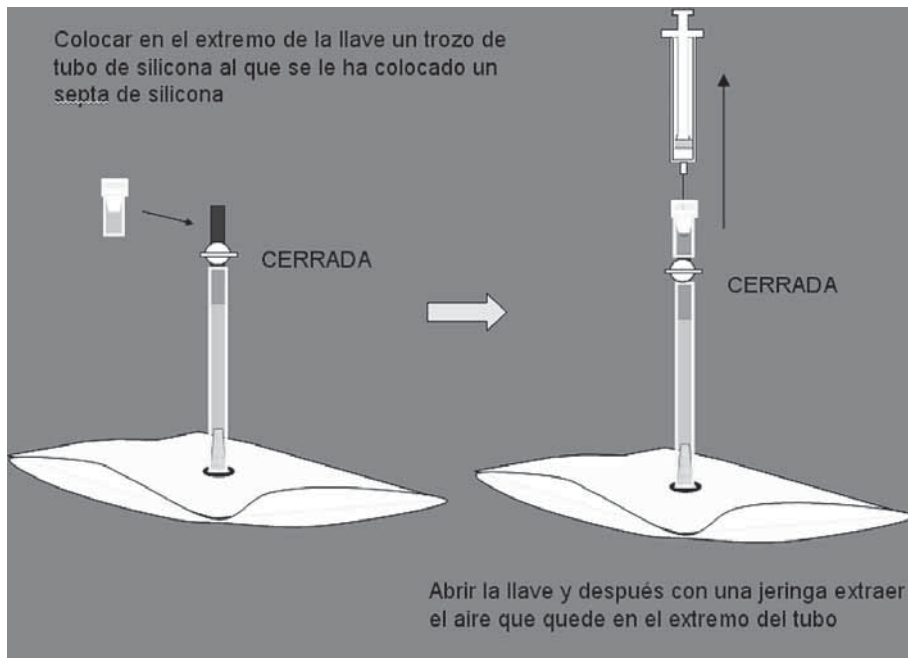
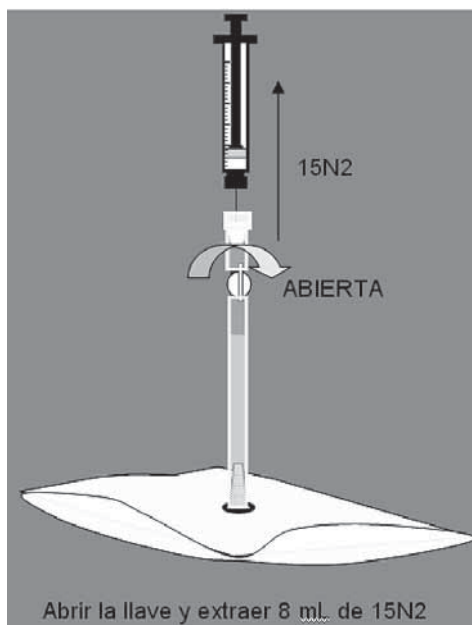


Figura 2. Esquema que muestra el procedimiento para hacer el vacío en el tubo del extremo de la llave de plástico conectada a la bolsa.



A continuación el  $^{15}\text{N}_2$  se extraerá de la bolsa, pinchando con una jeringa Hamilton gas-tight a través del septa de silicona que se ha colocado en el extremo de la llave de plástico (ver Figura 3). El  $^{15}\text{N}_2$  extraído de la bolsa se inyectará inmediatamente en las botellas de 4 l a través de los tapones de septa de las mismas. Cambiar la aguja hipodérmica de la jeringa Hamilton cada vez que se vaya a inyectar una nueva botella.

Figura 3. Esquema que muestra la extracción de  $^{15}\text{N}_2$  de la bolsa.

Mantener limpio el septa de silicona de la bolsa de muestro de  $^{15}\text{N}_2$  y protegido de fuentes de contaminación (en cualquier caso se reemplazará por uno nuevo de forma periódica, empleando guantes para su colocación).

Una vez que se haya tomado todo el  $^{15}\text{N}_2$  necesario para las incubaciones, cerrar la llave de plástico que va conectada a la bolsa que contiene el  $^{15}\text{N}_2$ . El resto del  $^{15}\text{N}_2$  que quede en la bolsa se podrá utilizar en la siguiente estación en las que se vayan a realizar incubaciones. Guardar la bolsa protegida de cualquier objeto cortante, punzante que pueda dañarla. Lo más adecuado es guardarla en una caja cerrada separada de cualquier otro tipo de material.

Tras inyectar los 8 ml de  $^{15}\text{N}_2$  en la botella de incubación, con una jeringa de plástico de 10 o 20 ml y una aguja se retirarán 8 ml de agua de la botella (el volumen equivalente al  $^{15}\text{N}_2$  inyectado). Para lo cual las botellas se inclinarán haciendo que la burbuja de gas se aleje del cuello de la botella, de forma que no se corra riesgo de retirar parte del  $^{15}\text{N}_2$  inyectado al retirar el agua con la jeringa de plástico. Emplear una jeringa limpia y una aguja hipodérmica nueva para cada botella.

### *Incubaciones ( $^{15}\text{N}_2$ )*

Tras la inyección de  $^{15}\text{N}_2$ , las botellas se agitarán suavemente y las muestras se incubarán en la cubierta del buque oceanográfico durante 24 h.

Las incubaciones se realizarán en 4 incubadores (cajas de plástico opacas de aproximadamente 180 l de capacidad), uno para cada profundidad de muestreo. Los incubadores se llenarán con agua de mar de superficie. El agua en los incubadores se mantendrá próxima a la temperatura superficial del mar mediante bombeo continuo de agua desde la superficie.

Durante las incubaciones la intensidad de luz en el interior de los incubadores será ajustada para simular las condiciones lumínicas *in situ* empleando para ello filtros de densidad neutra (malla de nailon de 1.5 mm de luz). En estos incubadores también se llevarán a cabo de forma simultánea las incubaciones para determinar las tasas de consumo de  $^{15}\text{NO}_3^-$ ,  $^{15}\text{NH}_4^+$  y  $^{15}\text{N}$ -urea, como se indica más adelante.

### *Filtración*

Una vez finalizado el periodo de incubación se filtrará el contenido de las botellas (a baja presión 100-150 mm Hg) a través de filtros Whatman GF/F de 2.5 cm de diámetro (precalcinados a 450 °C durante 4 horas).

Los filtros serán introducidos en viales y serán secados (en el interior de los viales) a 60 °C durante 24 horas. Finalmente los viales serán cerrados herméticamente y se almacenarán hasta su análisis mediante espectrometría de masas.

## Consumo de $^{15}\text{NO}_3^-$ , $^{15}\text{NH}_4^+$ y $^{15}\text{N}$ -urea

### *Muestreo*

De cada profundidad se tomarán muestras de agua de mar en botellas de policarbonato transparente de 2 l de capacidad nominal (previamente tratadas con ácido clorhídrico diluido y lavadas varias veces con agua Elix, seguido de lavados con agua Milli-Q y finalmente enjuagadas dos veces con unos 150 ml del agua de mar de la profundidad de muestreo). Las botellas se llenarán hasta la marca del cuello (las botellas se calibrarán previamente en el laboratorio). Cada botella deberá ser identificada para tener en cuenta el volumen de cada una de ellas en las incubaciones. Por lo que habrá que tomar nota de las botellas empleadas y del volumen de las mismas.

### *Adiciones de sustratos*

Las adiciones de los sustratos a las botellas para la incubación se realizarán a partir de patrones de  $^{15}\text{NO}_3^-$ ,  $(\text{Na}^{15}\text{NO}_3)$   $^{15}\text{NH}_4^+$   $((^{15}\text{NH}_4)_2\text{SO}_4)$  y  $^{15}\text{N}$ -urea, 2.25 mM y/o 11.25 mM, dependiendo de las concentraciones de estos nutrientes en el medio, de forma que la concentración añadida sea aproximadamente 10% de la concentración en el medio.

Si por motivos técnicos no se pudiera disponer de datos de nutrientes n-urea de la estación en la que se van a realizar los ensayos, entonces se adicionarían a todas las muestras 0.08 ml de los patrones 2.25 mM para alcanzar concentraciones finales nominales de  $0.08 \mu\text{M}^{15}\text{NO}_3^-$ ,  $^{15}\text{NH}_4^+$  y  $^{15}\text{N}$ -urea.

De todos los sustratos  $\text{Na}^{15}\text{NO}_3$ ,  $((^{15}\text{NH}_4)_2\text{SO}_4)$  y  $^{15}\text{N}$ -urea se prepararán patrones concentrados 11.25 mM. Para ello se pesarán las siguientes cantidades:

$\text{Na}^{15}\text{NO}_3$  : 96.74 mg  
 $((^{15}\text{NH}_4)_2\text{SO}_4)$  : 134.13 mg  
 $^{15}\text{N}$ -urea: 69.80 mg

Al barco se llevarán prepesados estos patrones en botes conteniendo las cantidades indicadas. Los patrones 11.25 mM se prepararán en el barco, añadiendo a cada uno de los botes con patrones prepesados suficiente agua Milli-Q y dejando disolver el sustrato con cuidado. El contenido del bote se trasvasará con cuidado en un matraz de 100 ml. Para arrastrar los restos de disolución que queden en el bote se añadirán unos ml más de agua Milli-Q al bote donde se ha disuelto el patrón, vertiendo el agua en el matraz de 100 ml. Enrasar a 100 ml con agua Milli-Q. Repetir la operación si es necesario.

Del patrón concentrado de 11.25 mM y para cada uno de los sustratos ( $\text{Na}^{15}\text{NO}_3$ ,  $((^{15}\text{NH}_4)_2\text{SO}_4)$  y  $^{15}\text{N}$ -urea) se prepararán 30 alícuotas de 3 ml en tubos de plástico de 4-5 ml de volumen. Las alícuotas se congelarán a  $-20^\circ\text{C}$ , de esa forma se dispondrá de un *stock* de patrones concentrados



para toda la campaña. A partir de los patrones concentrados se prepararán patrones diluidos de concentración 2.25 mM.

Para preparar el patrón 2.25 mM ( $^{15}\text{NO}_3^-$ ,  $^{15}\text{NH}_4^+$  y  $^{15}\text{N}$ -urea) se tomarán 4 ml de agua Milli-Q y se añadirá 1 ml del patrón 11.25 mM correspondiente ( $^{15}\text{NO}_3^-$ ,  $^{15}\text{NH}_4^+$  o  $^{15}\text{N}$ -urea). El patrón concentrado (11.25 mM) debe estar bien atemperado antes de su uso y se debe agitar bien antes de usar. Preparar el patrón de 2.25 mM cada 6 días o cuando este se agote.

En el caso de que se conozcan las concentraciones de nutrientes en la estación, el patrón utilizado y volumen de mismo empleado para realizar las adiciones de sustratos marcados con  $^{15}\text{N}$  a las botellas de incubación deberá ser calculado en función de las concentraciones de nutrientes presentes en el medio, de forma que la concentración añadida sea ligeramente inferior o igual al 10% de la concentración de nutriente presente en el medio. En caso de desconocer la concentración de nutrientes y urea se adicionarán estos para alcanzar una concentración final de  $0.08\ \mu\text{M}$ . Tras finalizar la adición cerrar bien las botellas, agitarlas suavemente y ponerlas a incubar.

Cambiar de punta cada vez que se vaya a pipetear el patrón marcado con  $^{15}\text{N}$  para añadirlo a una botella para incubación, tanto si es el mismo sustrato como si es otro diferente (de esa forma se evita la potencial contaminación del patrón). Tomar las precauciones para evitar que la pipeta se contamine al pipetear los patrones.

Tras realizar las adiciones guardar en nevera los patrones de 2.25 mM y 11.25 mM para su empleo en la siguiente estación.

### *Incubaciones*

Las incubaciones se realizarán en la cubierta del buque en 4 incubadores, como se ha descrito anteriormente en el protocolo para la fijación de  $^{15}\text{N}_2$ . Se seguirá el protocolo de Kanda (2008) con el objeto de tener medidas diarias de consumo de formas de nitrógeno disueltas, comparables con la fijación de  $\text{N}_2$ . Cada incubador se utilizará para realizar los ensayos correspondientes a una determinada profundidad de muestreo e irá dotado del filtro de densidad neutra adecuada para simular las condiciones de luz a cada una de las profundidades. Es conveniente controlar la temperatura de los incubadores periódicamente y regular el flujo de agua de mar en los incubadores cuando sea necesario. Para evitar diferencias de temperatura entre incubadores y mantenerlos bien refrigerados, el caudal de agua debe ser el máximo posible.

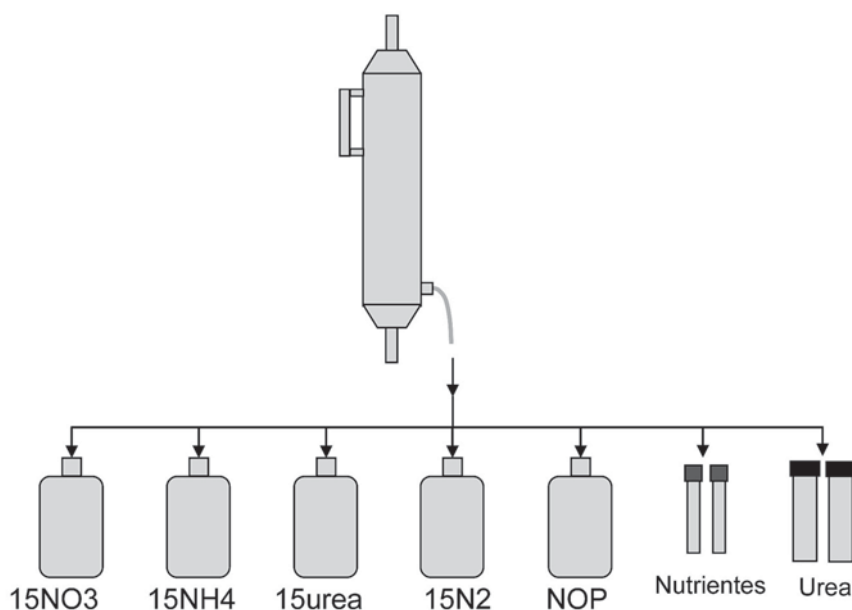
### *Filtraciones*

Tras finalizar el periodo de incubación el contenido de las botellas será filtrado a través de filtros Whatman GF/F de 2.5  $\mu\text{m}$ , que habrán sido precalci-

nados a 450 °C durante 4 horas. Tras las filtraciones, los filtros serán lavados un par de veces con agua de mar envejecida y filtrada (GF/F), para eliminar posibles trazas de los sustratos marcados isotópicamente. Los filtros serán tratados de forma similar a la descrita para la fijación de  $^{15}\text{N}_2$  y se almacenarán hasta su envío para análisis mediante espectrometría de masas.

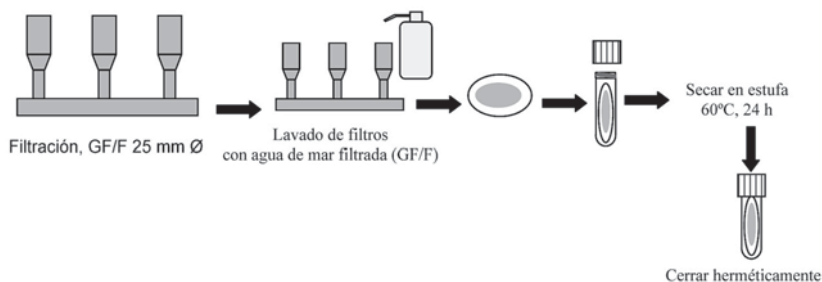
### Cuadro sinóptico de la técnica

#### Muestreo:



Para NOP se tomarán 2 réplicas para cada muestra.

#### Filtración:



## Cálculo de los resultados

### *Fijación de $^{15}\text{N}_2$*

El enriquecimiento inicial en  $^{15}\text{N}$  (% en átomos) del  $\text{N}_2$  contenido en la muestra tras inyectar el  $^{15}\text{N}_2$  se calculará para cada botella (teniendo en cuenta el volumen de  $^{15}\text{N}_2$  añadido y el volumen de la botella de incubación) utilizando la ecuación de Weiss (1970) (considerando que el  $\text{N}_2$  presente en la muestra se encuentra en equilibrio con la atmósfera). El enriquecimiento en  $^{15}\text{N}$  del nitrógeno orgánico particulado en la muestra al final del experimento y las tasas de fijación de  $^{15}\text{N}_2$  por la comunidad se estimarán aplicando las ecuaciones de Montoya et ál. (1996).

### *Consumo de $^{15}\text{NO}_3^-$ , $^{15}\text{NH}_4^+$ y $^{15}\text{N}$ -urea*

Las tasas de incorporación de  $^{15}\text{NO}_3^-$ ,  $^{15}\text{NH}_4^+$  y  $^{15}\text{N}$ -urea serán calculadas usando las ecuaciones de Dugdale y Wilkerson (1986). Las tasas de consumo  $\text{NH}_4^+$  serán corregidas para tener en cuenta el efecto de la dilución isotópica debido a la regeneración de  $\text{NH}_4$ . Para ello se emplearán las ecuaciones de Kanda et ál. (1987). La f-ratio (Eppeley y Peterson, 1979) será calculada a partir de esos valores.

## Control de calidad

### Contenido de $^{15}\text{N}$ sobre los filtros calcinados.

Algunos filtros GF/F calcinados de los que se emplearán para las filtraciones se guardarán para tomar su valor de referencia con respecto a su contenido en  $^{15}\text{N}$ . Se tomarán 2 filtros de cada caja de 100. Anotar en el estadillo y rotular adecuadamente los viales.

## Precauciones

Utilizar guantes desechables en todo el proceso de muestreo, incubaciones y filtrado y guardar la máxima precaución para evitar posible contaminación de las muestras de cualquier tipo de fuente.

Para estimar el enriquecimiento inicial en  $^{15}\text{N}$  del NOP hay que emplear otro sistema de filtración distinto del utilizado para las muestras tratadas con marcadores isotópicos. Además conviene mantener este sistema lo más alejado posible del sistema de filtración de incubaciones (enriquecido en  $^{15}\text{N}$ ) para evitar cualquier contaminación de las muestras. Cambiar de guantes si se van a manipular muestras después de haber manipulado patrones o muestras marcados con  $^{15}\text{NO}_3^-$ ,  $^{15}\text{NH}_4^+$  o  $^{15}\text{N}$ -urea.

## Limpieza de material

Una vez finalizado el muestreo y las incubaciones es necesario llevar a cabo la limpieza de todo el material empleado en las mismas. Todas las botellas empleadas, así como el material usado (embudos, botes, tubos de silicona, etc.) deberán ser tratados con HCl diluido y posteriormente lavados varias veces con Elix y finalmente 2 veces con agua Milli-Q, de forma que puedan emplearse en siguientes estaciones de muestreo. Utilizar guantes durante la limpieza del material y tomar las medidas de protección y precauciones adecuadas (gafas, guantes y otras protecciones) durante el manejo de ácido clorhídrico concentrado y diluido.

## Referencias

- CAPONE, D. G., J. P. MONTOYA. 2001. «Nitrogen fixation and denitrification». In: Paul, J. H. (eds.), *Methods in Microbiology*, Vol. 30, Marine Microbiology. Academic Press, pp. 501-515.
- DUGDALE, R. W., F. P. WILKERSON. 1986. «The use of  $^{15}\text{N}$  to measure nitrogen uptake in eutrophic oceans: experimental considerations». *Limnol. Oceanogr.* 12: 196-206.
- DUGDALE, R. C., J. J. GOERING. 1967. «Uptake of new and regenerated forms of nitrogen in primary productivity». *Limnol. Oceanogr.* 12: 196-202.
- EPPLEY, R. W., B. J. PETERSON. 1979. «Particulate organic matter flux and new production in the deep ocean». *Nature* 282: 677-680.
- KANDA, J., E. A. LAWS, T. SAINO, A. HATTORI. 1987. «An evaluation of isotope dilution effect from conventional data sets of  $^{15}\text{N}$  uptake experiments». *J. Plank. Res.* 9: 79-90.
- KANDA, J. 2008. «Vertical profiles of nitrate uptake obtained from in situ  $^{15}\text{N}$  incubations experiments in the western North Pacific». *J. Mar. Syst.* 71: 63-78.
- MONTOYA, J. P., M. VOSS, P. KÄHLER, D. CAPONE. 1996. «A simple, high-precision, high sensitivity tracer assay for  $\text{N}_2$  fixation». *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 986-993.
- RAIMBAULT, P., N. GARCÍA. 2007. «Carbon and nitrogen uptake in the South Pacific Ocean: evidence for efficient dinitrogen fixation and regenerated production leading to large accumulation of dissolved organic matter in nitrogen-depleted waters». *Biogeosc.* 4: 3531-3579.
- WEISS, R. F. 1970. «The solubility of nitrogen, oxygen and argon in water and seawater». *Deep-Sea Res.* 29: 459-469.
- ZEHR, J. P., J. B. WATERBURY, P. J. TURNER, J. P. MONTOYA, E. OMOREGIE, G. F. STEWARD, A. HANSEN, D. M. KART. 2001. «Unicellular cyanobacteria fix  $\text{N}_2$  in the subtropical North Pacific Ocean». *Nature* 412: 635-638.

## Determinación manual de urea en agua de mar

Ramírez, T.; Filgueiras, A. V.; Gago, J.

*Instituto Español de Oceanografía*

### Finalidad. Campo de aplicación

Para poder calcular las tasas de consumo de urea es necesario conocer las concentraciones de urea presentes en el medio. Para la determinación de urea se empleará el método manual de Goeyens et ál. (1998) y en principio las medidas de urea se realizarán únicamente en las estaciones y a las profundidades a las que se vaya a medir el consumo de  $^{15}\text{N}$ -urea a lo largo de la campaña de circunnavegación.

### Conceptos generales

El método desarrollado por Goeyens et ál. (1998) es un método muy adecuado para trabajar a bordo, sobre todo teniendo en cuenta que el control de temperatura y de los tiempos de incubación es difícil en campaña, y además es más económico al no requerir el uso de baños a alta temperatura.

Básicamente se siguen los pasos indicados en el método de alta  $T^a$  (Mulvenna y Savidge, 1992), pero se omite la incubación de las muestras a 85 °C. En vez de esto se mantienen las muestras en la oscuridad a temperatura ambiente ( $22\pm1$  °C) durante 3 días. Este método es válido para rangos de urea de 0 a 10  $\mu\text{M}$ . El protocolo se ha optimizado para facilitar la realización de medidas a bordo del buque.

### *Toma de muestras*

Las muestras para el análisis de la urea se recogen directamente desde las botellas Niskin. Para la toma de muestras de agua de mar de la botella

Niskin se emplearán botes de polipropileno con tapón de rosca de 50 ml de capacidad (tubos tipo Falcon). Los botes serán previamente lavados 2 veces con el agua que se va a muestrear. Es conveniente el uso de guantes desechables en todo el proceso de muestreo y análisis de nutrientes a fin de evitar la contaminación de las muestras. Los baños y aseos del barco no deben emplearse durante el muestreo de nutrientes, incluida la urea.

### *Conservación de las muestras*

Una vez tomadas las muestras de agua, los botes con las mismas deben ser almacenados en la oscuridad y en frío (en una nevera) hasta que los análisis sean realizados en el mismo día de muestreo. En caso de que no sea posible su análisis a bordo las muestras se congelarán a  $-20^{\circ}\text{C}$ . La filtración de las muestras es desaconsejable, en el caso de estas muestras es preferible evitar cualquier manipulación que pueda contaminarlas.

### **Equipamiento necesario**

Balanza; estufa; espectrofotómetro con portaceldas para alojar cubetas de 5 cm; agitador-vórtex; agitador magnético; desecador; micropipetas de 20-200  $\mu\text{L}$ , 200-1000  $\mu\text{L}$ , 1-5 ml y de 5-10 ml; nevera; congelador.

### **Reactivos u otro material fungible**

#### *Material fungible:*

Guantes desechables; tubos desechables polipropileno de 50, 20 y 15 ml; frascos de vidrio color ámbar de 20 ml y 125 ml; gradillas de plástico; imanes recubiertos de teflón; matraces de 100 ml y 250 ml; vasos de precipitado de vidrio de 250 y 500 y 1000 ml; frascos de 250 ml de vidrio; botellas de vidrio de color ámbar de 1 L; papel de aluminio; probetas de 100 y 500 ml; cubetas de vidrio óptico de 5 cm de paso de luz; frascos lavadores; puntas para micropipetas.

#### *Reactivos:*

Diacetil monoxima, tiosemicarbazida, ácido sulfúrico, cloruro férrico hexahidratado, urea, cloruro sódico, agua Elix y Milli-Q.

### *Preparación de Reactivos*

#### **Cloruro sódico**

- Cloruro sódico, NaCl. Disolver 21.3 g y llevar a 150 ml con agua Milli-Q. El NaCl se llevará prepesado en frascos de plástico de 50 ml

desde el laboratorio. Para su preparación a bordo el contenido del bote se transferirá a un frasco de 250 ml de vidrio pyrex. Con una probeta se tomarán 140 ml de agua Milli-Q y parte del cual se añadirá al bote que contenía el NaCl sólido, con el fin de arrastrar los restos. El contenido del bote será transferido al frasco pyrex junto con el resto del agua Milli-Q. Agitar bien hasta la completa disolución del NaCl. Guardar en nevera.

- Para evitar cualquier tipo de contaminación de los 150 ml de NaCl preparados tomar en un bote o vaso de precipitado limpio el volumen necesario para el análisis diario. Guardar el resto de la disolución de NaCl sobrante en nevera para su uso en las siguientes estaciones. Trascurrida una semana preparar nuevo reactivo.

### Reactivo A

- Disolver 3.35 g de diacetil monoxima (2,3-butanodiona monoxima),  $\text{CH}_3\cdot\text{COC}\cdot(\text{NOH})\cdot\text{CH}_3$  en 100 ml de agua destilada. Al barco se llevarán 20 botes de vidrio de 125 ml de color ámbar conteniendo cada uno de ellos 3.35 g de diacetil monoxima para preparar allí las disoluciones. Para preparar la disolución, medir con una probeta 100 ml de agua Milli-Q y verter el contenido al bote conteniendo la diacetil monoxima. Disolver la diacetil monoxima. Finalmente almacenar la disolución en la misma botella ámbar en la que se ha preparado (si no se dispone de botella de color ámbar emplear papel de aluminio para cubrir el frasco completamente).
- Preparar una disolución de 0.15 g de tiosemicarbacida,  $\text{NH}_2\cdot\text{NH}\cdot\text{CS}\cdot\text{NH}_2$ , en 15 ml de agua destilada. Preparar una disolución para cada 3 estaciones en las que se vaya a determinar urea. Este reactivo habrá que llevarlo prepesado desde el laboratorio al buque. Para ello se prepararán al menos 26 botes de unos 20 ml con tapón de rosca, cada uno de ellos conteniendo 0.15 g de tiosemicarbacida (se pueden emplear los tubos de vidrio ámbar y tapón de rosca que se compraron). Con una pipeta de 10 ml añadir 15 ml de agua Milli-Q al bote que contiene la tiosemicarbacida, cerrar el bote con el tapón de rosca y disolver agitando. Conservar en nevera protegida de la luz. Emplear la disolución durante una semana como máximo (análisis en 3 estaciones). Después volver a preparar reactivo utilizando los botes que se llevan prepesados al barco.
- El reactivo A se preparará añadiendo 3.85 ml de la disolución de tiosemicarbacida a la primera disolución, empleando una micropipeta de 5 ml. Agitar bien la mezcla. Según Koreleff (Grasshoff et ál. 1983) este reactivo es estable al menos una semana. Preparar por tanto el reactivo en el barco para ser empleado en los análisis de 3 estaciones, es decir, cada 7 días. Una vez pasado 7 días preparar nuevo reactivo. Guardar el resto de tiosemicarbacida en su bote y en nevera protegido de la luz.

### Reactivo B

- Con una probeta de 500 ml tomar 235 ml de agua Milli-Q y transferirlos a un vaso de precipitado de 1 l. Con una probeta de vidrio tomar 300 ml de ácido sulfúrico concentrado ( $d=1.84 \text{ g/cm}^3$ ) y añadir muy lentamente y con agitación los 300 ml de ácido sobre los 235 ml de agua Milli-Q. Dejar que la disolución se enfríe hasta que alcance la temperatura ambiente. Transferir la disolución a una botella vidrio de color ámbar de 1 l. Sería conveniente preparar las disoluciones de sulfúrico diluido necesarias en el laboratorio, para de esa forma evitar tener que preparar esa disolución a bordo.
- Preparar una disolución de cloruro férrico hexahidratado ( $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ) de 0.15 g en 10 ml de agua Milli-Q. El cloruro férrico se transportará al barco en viales prepesados de 20 ml de capacidad. Se prepararán al menos 10 viales, cada uno de ellos con 0.15 g de  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  para llevar al barco, donde se prepararán las disoluciones según vaya siendo necesario. Es necesario proteger la disolución de la luz.
- El reactivo B se prepara añadiendo 0.5 ml de la disolución de cloruro férrico a la primera disolución que contiene el ácido sulfúrico. Agitar bien. Almacenar en una botella ámbar y guardar en sitio oscuro. Este reactivo es estable meses. Preparar cada vez que sea necesario. Se estima que habrá que preparar este reactivo al menos 9 veces a lo largo de la campaña.

### Patrones

- *Stock* de solución estándar 10 mM. Pesar 150.15 mg de urea y diluir a 250 ml con agua Milli-Q en un matraz aforado. Para ello secar previamente cantidad suficiente de urea a  $95^\circ\text{C}$  durante 4 horas. Transcurrido este tiempo guardar en desecador y dejar atemperar bien antes de efectuar las pesadas. Para pesar la urea se utilizarán botes de vidrio previamente lavados con ácido.
- Para la preparación de patrones en el buque al mismo se llevarán varios botes en los que se habrá pre-pesado una cantidad de urea lo más próxima posible a la cantidad indicada (150.15 mg). Anotar en cada bote la cantidad pesada exactamente para cada uno de ellos. Para preparar la disolución patrón, tomar uno de los botes con la urea prepesada y añadir suficiente volumen de agua destilada para disolver la urea. Con cuidado transferir la urea disuelta desde el bote a un vaso de precipitado. Lavar con cuidado el bote que contenía la urea prepesada varias veces con agua Milli-Q y vaciar su contenido en el mismo vaso de precipitado, arrastrando cualquier resto de urea que haya podido quedar en el bote. Con cuidado transferir la disolución de urea desde el vaso de precipitado a un matraz aforado de 250 ml. Arrastrar con unos ml de agua Milli-Q los restos de solución de urea que queden en el vaso de precipitado y añadirlos



al matraz, repetir la operación varias veces. Finalmente enrasar a 250 ml con agua Milli-Q.

- Este estándar contiene 10 mM de urea. Una vez preparado, tomar alícuotas de 10 ml y congelarlas a -20 °C en viales con tapón de rosca. Congelar al menos 25 tubos, con vistas a utilizar el contenido de 1 tubo cada dos días de muestreo a lo largo de la campaña de circunnavegación para preparar los patrones correspondientes. La urea sobrante tras el primer uso se guardaría en nevera para el análisis siguiente.
- Las alícuotas se emplearán para preparar una disolución de 100  $\mu\text{M}$  (ver más adelante). Para ello será necesario descongelar el tubo y dejar atemperar bien antes de usar.

### Calibración

- Los patrones se preparan a partir de la solución de urea 100  $\mu\text{M}$ , la cual se preparará partiendo de un patrón de urea 10 mM. Para ello descongelar una alícuota de patrón de urea 10 mM y dejarla atemperar. Tomar 1.0 ml de este patrón transfiriéndolo a un matraz aforado de 100 ml, enrasando con agua Milli-Q.
- Preparar una curva de calibración con 5 puntos (0.5  $\mu\text{M}$ , 1.0  $\mu\text{M}$ , 2.0  $\mu\text{M}$ , 3  $\mu\text{M}$  y 5  $\mu\text{M}$  de urea) a partir de la disolución de urea 100  $\mu\text{M}$  (como se indica en la tabla más abajo). Preparar simultáneamente 3 blancos, como se indica en la tabla.
- Preparar un conjunto de tubos de 50 ml con tapón de rosca para realizar la curva de calibración y los blancos. Añadir los reactivos en el siguiente orden:
  1. Añadir a cada tubo los ml de agua Milli-Q necesarios para completar 15 ml (ver tabla siguiente).
  2. Seguidamente a cada uno de ellos añadir 5 ml de la solución de NaCl (21.3 g/150 ml) a todos los patrones y blancos.
  3. Después añadir el volumen correspondiente de estándar 100  $\mu\text{M}$  (como se indica en la tabla).
  4. A continuación añadir a los tubos de los patrones el volumen correspondiente de estándar 100  $\mu\text{M}$  (como se indica en la tabla), utilizando las micropipetas disponibles.
  5. Seguidamente añadir 1.40 ml del reactivo A a los patrones y blancos. Comenzar por los blancos y finalizar por el patrón de mayor concentración.
  6. Tras añadir el reactivo A, agitar los tubos en un vórtex durante 3 s, ajustando previamente la agitación para evitar salpicaduras.
  7. Inmediatamente añadir con cuidado 4.6 ml del reactivo B a todos los patrones y a los blancos. Seguir el orden indicado anteriormente comenzando por los blancos y finalizando por los patrones más altos.

8. Después agitar los tubos durante 4 segundos (evitando salpicaduras) y seguidamente tapar los tubos con un tapón de rosca.
9. Cubrir inmediatamente los tubos con papel de aluminio (tener preparados con anterioridad) e incubar en la oscuridad y a temperatura ambiente de 22 °C ( $\pm 1$ ) durante 72 h.

Conc. de urea (en 20 ml)	ml agua Milli-Q	ml NaCl	$\mu\text{L}$ Urea 100 $\mu\text{M}$	ml reactivo A	ml reactivo B
0.00 $\mu\text{M}^\#$	15.00 ml	5.00	0 $\mu\text{L}$	1.40 ml	4.60 ml
0.50 $\mu\text{M}$	14.90 ml	5.00	100 $\mu\text{L}$	1.40 ml	4.60 ml
1.00 $\mu\text{M}$	14.80 ml	5.00	200 $\mu\text{L}$	1.40 ml	4.60 ml
2.00 $\mu\text{M}$	14.60 ml	5.00	400 $\mu\text{L}$	1.40 ml	4.60 ml
3.00 $\mu\text{M}$	14.40 ml	5.00	600 $\mu\text{L}$	1.40 ml	4.60 ml
5.00 $\mu\text{M}$	14.00 ml	5.00	1000 $\mu\text{L}$	1.40 ml	4.60 ml

*#Los blancos se preparan en triplicado para tomar el valor medio de la absorbancia.*

Después de añadir el NaCl y antes de añadir los reactivos el volumen contenido en los tubos es de 20 ml. La concentración de urea está calculada para este volumen. Tras añadir los reactivos el volumen final en los tubos es de 26 ml.

### *Análisis de las muestras*

- A cada tubo se transfiere un volumen de 20 ml de muestra de agua de mar correspondiente, empleando la micropipeta de 10 ml. De cada profundidad se realizarán análisis por duplicado. Asegurarse de cambiar la punta entre muestras de diferentes profundidades.
- A continuación se le añaden a cada tubo 1.40 ml del reactivo A utilizando una micropipeta de 5 ml.
- Agitar con un vórtex los tubos durante 3 s, evitando salpicaduras.
- A continuación añadir 4.60 ml del reactivo B.
- Agitar la mezcla en un vórtex durante 4 s y cerrar el tubo con un tapón. Cubrir el tubo con papel de aluminio e incubar en la oscuridad durante 72 horas a 22 °C ( $\pm 1$ ). Hacer medidas por duplicado para cada profundidad.

### **Descripción de la técnica**

Las absorbancias de los blancos, patrones y muestras se miden al cabo de 72 horas de incubación a temperatura ambiente (22 °C  $\pm 1$ ). Las medidas se realizan a una longitud de onda de 520 nm. Para las medidas se emplea-

rá un espectrofotómetro dotado de portacubetas para cubetas de 5 cm y se usarán cubetas de vidrio óptico de 5 cm. Comenzar las medidas por los blancos y patrones. El volumen de las cubetas de 5 cm de paso óptico es de 17.5 ml por lo que hay suficiente volumen de muestra (26 ml) para realizar las medidas, pudiéndose emplear algunos mililitros de volumen de muestra para lavar la cubeta con un poco de la propia muestra.

Las medidas se realizarán siguiendo los siguientes pasos:

- Hacer el autocero con Agua Milli-Q a 520 nm.
- Medir las absorbancias de los blancos a 520 nm. Como valor del blanco se utilizará el valor medio de la absorbancia de los 3 blancos preparados simultáneamente.
- Medir las absorbancias de los patrones (comenzando por el más diluido).
- Medir las absorbancias de las muestras, de forma que las réplicas sean medidas de dos en dos, de forma seguida.

Lavar bien las cubetas entre medidas con agua Milli-Q (varias veces), dejándolas escurrir antes de volver a medir (durante unos minutos); después enjuagar la cubeta con unos 4 ml-5 ml de la propia muestra que se va a medir (no usar demasiada cantidad de muestra para lavar, y asegurarse de que el volumen que queda será suficiente para la medida). Antes de realizar las medidas de absorbancia de cada patrón asegurarse de secar bien y dejar completamente limpias las caras ópticas de las cubetas (emplear para ello un trozo de papel suave humedecido con agua Milli-Q).

Puesto que el color desarrollado por los blancos, patrones y muestras se ve afectado por la luz, retirar el papel de aluminio de cada tubo justo antes de hacer la medida de cada muestra.

Realizar una curva de calibración y los respectivos blancos cada vez que se vayan a efectuar medidas de urea (coincidiendo con las estaciones donde se determinen consumo de  $^{15}\text{N}$ -urea).

### Cuadro sinóptico de la técnica



### Cálculo de los resultados

Calcular la concentración de urea en cada estación a partir de la curva de calibración realizada ese mismo día. Anotar la temperatura de incubación de las muestras varias veces a lo largo del periodo de incubación y

hacer un registro con las diferentes curvas de calibración obtenidas a las diferentes temperaturas de incubación.

Las concentraciones de urea en las muestras se calcularán a partir de las curvas de calibración obtenidas cada día de análisis, tras representar las absorbancias frente a las concentraciones de los estándares de urea. La concentración de urea en las muestras será:

$$[urea] = \frac{(As - Ab)}{a}$$

donde As-Ab es la absorbancia de la muestra menos la absorbancia media de los blancos y "a" la pendiente de la recta de calibración.

### Control de calidad

La mayor parte del material que se empleará será material desechable de plástico (puntas, tubos, etc.). Este material suele venir en condiciones adecuadas de fábrica, por lo que no es necesario ningún tratamiento ni lavado previo del mismo. El resto del material de plástico o vidrio (probetas, vasos de precipitado, matraces, imanes recubiertos de teflón, etc) habrá que limpiarlo de forma adecuada y lavarlo con HCl diluido, con varios lavados posteriores con Milli-Q. Durante la limpieza del material emplear guantes desechables.

Una vez limpio el material, dejarlo secar en un sitio limpio y guardar en un sitio protegido. Tomar todas las precauciones posibles para evitar la contaminación del material empleado en el análisis y muestreo.

### Referencias

- GOEYENS, L., N. KINDERMANS, M. ABU YUSUF, M. ELSKENS. 1998. «A room temperature for the manual determination of urea in seawater». *Estuar. Coast. Shelf Sci.* 47: 415-418.
- GRASSHOFF, K., M. EHRHARDT, K. KREMLING (eds.). 1983. *Methods of seawater analysis*. Verlag Chemie, Weinheim, Alemania.
- MULVENNA, P. F., G. SAVIDGE. 1992. «A modified manual method for the determination of urea in seawater using diacetylmonoxime reagent». *Estuar. Coast. Shelf Sci.* 34: 429-438.

## Muestreo de metales y vitaminas disueltas

<sup>1</sup>Tovar Sánchez, A.; <sup>2</sup>Sañudo-Wilhelmy, S.

<sup>1</sup>*Instituto Mediterráneo de Estudios Avanzados (UIB-CSIC)*

<sup>2</sup>*University of Southern California, USA*

### Finalidad. Campo de aplicación

Recolección de muestras de agua para la determinación de las concentraciones de metales (e.g. Fe, Co, Cu, Pb), y vitaminas (e.g. B<sub>12</sub>, B<sub>1</sub>) disueltas.

### Conceptos generales

Tantos los metales traza como las vitaminas juegan un papel fundamental en los procesos biogeoquímicos relacionados con la producción primaria oceánica.

Su distribución y disponibilidad son clave para entender el papel que juega en el funcionamiento de los océanos.

### Equipamiento necesario

Para el muestreo de agua superficial usaremos el sistema de torpedo (Figura 1), compuesto por:

- Compresor.
- Bomba de diafragma de aire comprimido.
- Manguera con tubo de teflón en su interior.
- Torpedo.

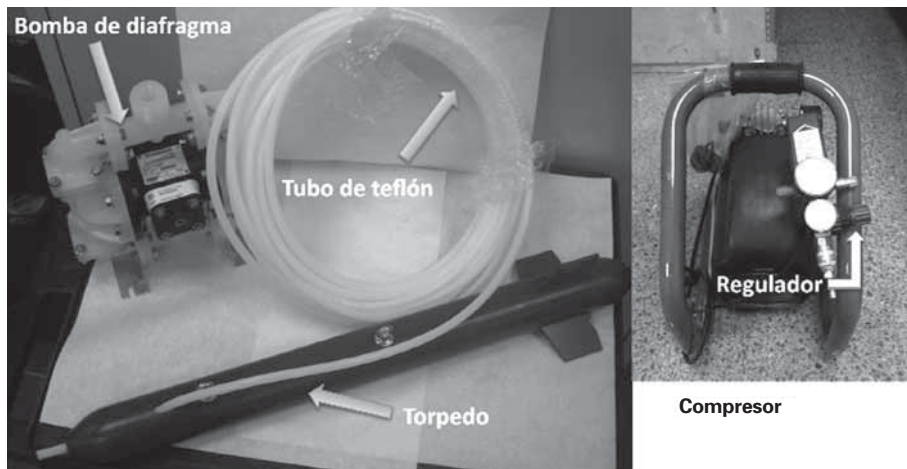


Figura 1. Sistema de torpedo.

### Reactivos u otro material fungible

El resto de material necesario para el muestreo consta de (Figura 2):

- Botellas de plásticos (LDPE) de 0.5 l.
- Botellas de plástico opacas de 2 l.
- Cartuchos de filtración.
- Guantes de plástico.
- Ácido clorhídrico 0.5 N.



Figura 2. Material fungible.

## Descripción de la técnica

A) **Montaje del sistema:** todo el sistema debería montarse en la cubierta de proa 10 minutos antes de la hora prevista para el muestreo. Un extremo del tubo de teflón (ubicado dentro de la manguera) se encuentra ya conectado al torpedo mientras que el otro debe conectarse a la bomba de diafragma. Mediante una manguera de alta presión se conecta la bomba de diafragma al compresor y el compresor a la corriente eléctrica.

B) **Operación de despliegue e inmersión del torpedo:** la cabeza del torpedo se engancha al grillete de la grúa de proa mediante un cabo de 2 metros de longitud (el cabo evita que el gancho de la grúa toque y contamine el torpedo). La grúa con su máxima extensión saca el torpedo por la banda de estribor, alejándolo lo máximo posible del barco, y sumergiéndolo hasta 1-2 metros de profundidad (Figura 3).

**Nota:** durante su almacenaje la punta del tubo de teflón suele llevar una caperuza (tubo de goma) para evitar que entren partículas en el tubo y se contamine. Asegúrate de quitar esa caperuza antes de lanzar el torpedo y volver a ponerla una vez finalizado el muestreo.



Figura 3. Momento de despliegue del torpedo.



Figura 4. Operación de muestreo de agua.

C) **Muestreo:** una vez el torpedo está en el agua, el barco debe navegar entre 2-5 nudos, asegurándonos que el torpedo navega paralelo al barco sin salir del agua. Se enciende el compresor y una vez cebado el tubo (puede tardar unos 60-90 segundos) comienza a salir agua por la bomba. Antes de conectar el cartucho de filtración es necesario reducir la presión de salida del agua mediante el regulador del compresor. Una vez fluya el agua y conectado el cartucho de filtración, se deja transcurrir unos 3 minutos antes de llenar las botellas con la muestra (Figura 4).

Para minimizar la posibilidad de contaminación, el muestreo lo deberían de realizar siempre dos personas. Una persona (“manos sucias”) manipula el compresor y abre las bolsas donde se encuentran las botellas de muestreo, **en ningún caso se debe tocar la botella de muestreo sin guantes**. La otra persona (“manos limpias”) siempre provisto de guantes de plástico llena las botellas y sujeta el filtro. Si por cualquier razón tocase con los guantes alguna superficie del barco o material que no estuviese limpio con ácido deberá cambiar de guantes. Las botellas se enjuagan 3 veces y se llenan (Figura 5). En cada estación se muestrearán 2 botellas, una de 0.5 l traslúcida para el análisis de metales y otra de 2 l opaca para el análisis de vitaminas.

**Nota:** las botellas de 2 l opacas se almacenarán congeladas, por lo que no deben llenarse completamente.





Figura 5. Muestreo de agua (sin filtrar).

D) **Almacenamiento:** las botellas de 0.5 l para el análisis de metales son almacenadas y transportadas en doble bolsa Zipblock (usar las mismas en las que viene cada botella), y finalmente guardadas a temperatura ambiente en doble bolsa de plástico negra en el interior de un baúl de plástico.

Las botellas de 2 l para el análisis de vitaminas deben ser almacenadas y transportadas congeladas (entorno -8 a -12 °C), por lo que las botellas se almacenarán en un baúl de plástico que se ubicará en el interior de la cámara congeladora del *Hespérides*.



# Muestreo de agua de mar para el análisis de dimetilsulfuro (DMS) y dimetilsulfoniopropionato (DMSP) por cromatografía de gases (GC)

Galí, M.; Simó, R.

*Institut de Ciències del Mar (CSIC)*

## Finalidad. Campo de aplicación

Procedimiento de muestreo de agua de una botella Niskin para el posterior análisis del gas de azufre DMS (y su precursor algal DMSP) mediante cromatografía de gases.

## Conceptos generales

El DMS ( $\text{CH}_3\text{SCH}_3$ ) es un gas producido por la redes tróficas marinas a partir de su precursor DMSP ( $(\text{CH}_3)_2\text{S} + \text{CH}_2\text{CH}_2\text{COO}^-$ ), un compuesto intracelular multifuncional del fitoplancton. El DMS es emitido en gran cantidad del océano a la atmósfera, donde participa en la formación de aerosoles y de núcleos de condensación de nubes, potencialmente afectando al balance radiactivo del planeta.

## Equipamiento necesario

### *Muestreo (material que nos llevamos a cubierta)*

- 1 vial de vidrio de 120 ml.
- 1 vial de vidrio de 40 ml.
- 2 tapones-*septum* de goma gris con recubrimiento interior de teflón.
- 1 tubo de silicona.
- 1 malla de Nylon de 50  $\mu\text{m}$  de luz.

- Guantes (opcionales: no se conocen posibles contaminaciones de la muestra).
- 1 bandeja u otro recipiente (para transportar el resto de material).

### *Preservación de muestras de DMSP (en el laboratorio)*

- 1 tapón de silicona blanca (*septum*) con recubrimiento interior de teflón, acoplado a una cápsula de aluminio (*crimp cap*).
- *Pellets* de NaOH.
- Pinzas (usadas solamente para los pellets de NaOH, etiqueta verde).
- *Crimpador* (herramienta para sellar herméticamente las muestras de DMSP, Figura 1).
- Etiquetas.
- Rotulador permanente.

\* **Nota:** en la Figura 1 del manual para el análisis de DMS se puede ver parte del equipamiento usado en este protocolo.

### **Reactivos u otro material fungible**

Hidróxido de sodio (NaOH). Sigma Aldrich (*reagent grade, pellets, anhydrous*).

### **Descripción de la técnica**

#### *Antes de empezar*

1. Lavar la malla de 50  $\mu\text{m}$  con agua del continuo en el laboratorio.
2. Asegurarse de que otros gases más volátiles que el DMS ( $\text{O}_2$ ) han sido muestreados, en caso de que nos corresponda la misma botella.
3. El DMS es volátil: es importante evitar burbujeos y flujos de agua turbulentos y con salpicaduras al llenar los viales de muestreo (dentro de lo posible). Además, de esta forma vamos a evitar artefactos en la medida de DMS y DMSP causados por la rotura de células.

#### *Muestreo para DMS*

- Conectamos un extremo del tubo a la boca del grifo de la botella Niskin. Lo lavamos con un poco de agua de la botella (lo justo para que el agua llene todo el tubo una vez).
- Introducimos el tubo en un vial de 120 ml de forma que el otro extremo del tubo toque el fondo. Eso va a evitar burbujeo y salpicaduras en el momento de llenar el vial.

- Para lavar el vial, lo llenamos un poco (un dedo de agua), lo cerramos con el tapón gris, y enjuagamos completamente las paredes con un suave movimiento rotatorio, antes de vaciarlo. NO AGITAR, SIMPLEMENTE ROTAR.
  - Cubrimos el extremo libre del tubo con la malla de 50  $\mu\text{m}$ , y lo introducimos en el vial. Empezamos a llenar el vial dejando que el agua se deslice suavemente por las paredes.
  - Cuando esté totalmente lleno, dejamos un poco de *overflow* y tapamos rápidamente con el tapón de goma gris, dejando el mínimo aire posible dentro del vial. Presionamos el tapón gris fuertemente con la palma de la mano para asegurarnos de la estanqueidad del cierre.
- Al tratarse de un volátil, hay que analizarlo en fresco dentro de 1 hora (si es posible antes) después del muestreo.

### *Muestreo para DMSP total (DMSPt)*

El procedimiento es prácticamente idéntico que el del DMS, con la única diferencia de que NO PREFILTRAMOS el agua con la malla de 50  $\mu\text{m}$ . Además, el vial que llenamos es de 40 ml.

### *Conservación de la muestra de DMSP*

- Abrimos el vial de 40 ml y le añadimos dos pellets de NaOH. Lo tapamos rápidamente con el *septum* de silicona blanca y la cápsula (que ya vienen acoplados) y prensamos (Figura 1). Se formará un precipitado blanco; es normal. La adición de NaOH va a provocar la hidrólisis alcalina del DMSP, formando DMS + acrilato, y además va a conservar la muestra. De esta forma, el DMSP va a ser analizado

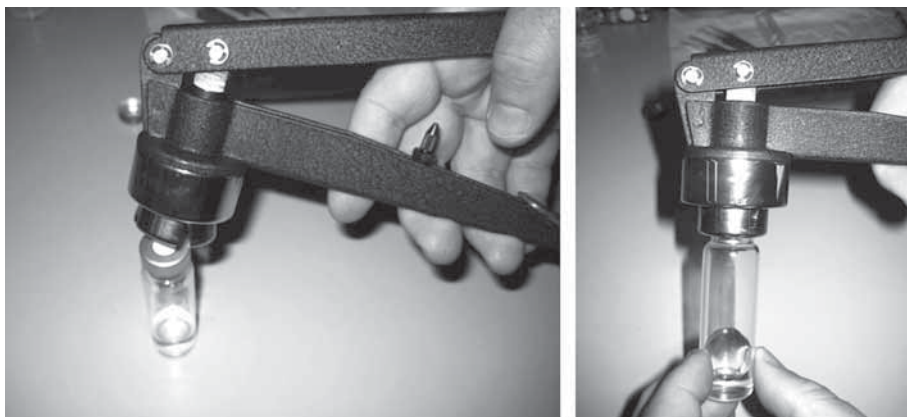


Figura 1. Sellando herméticamente un vial con la pinza prensora.

como DMS. El sistema de cierre es estanco (*gas tight*) evitando la pérdida del DMS.

- Guardamos la muestra en la oscuridad, a temperatura ambiente (por ej., dentro de un armario), adecuadamente etiquetada con la fecha, el número de estación y la profundidad.

### *Limpieza del material*

- Después del muestreo y/o análisis, habrá que lavar los viales usados con agua MQ, así como el tubo de silicona y la malla de 50  $\mu\text{m}$ . El *septum* gris también se tiene que reutilizar.

# **Análisis de DMS con cromatografía de gases (GC) acoplada a un detector fotométrico de llama (FPD) selectivo para azufre**

Galí, M.; Simó, R.

*Institut de Ciències del Mar (CSIC)*

## **Finalidad. Campo de aplicación**

Determinar la concentración de DMS en agua marina. El límite de detección de la técnica es de unos 3 pmol de azufre. Esto permite analizar concentraciones en el rango nM, hasta 0.5 nM (o, con mayor volumen de muestra, hasta 0.1 nM) con un error < 5%. La concentración de DMS en aguas oceánicas se encuentra generalmente entre 1 y 7 nM, alcanzando, en ocasiones, valores superiores a 10 nM.

Al tratarse de un gas traza, el análisis de DMS por GC requiere de una preconcentración. Para dicho fin se utiliza el sistema de purga y trampa criogénica. De forma resumida, se hace burbujear un flujo de un gas inerte (He en este caso) que arrastra todos los volátiles contenidos en la muestra. El flujo de He + volátiles es enfriado a su paso por una trampa criogénica que contiene N<sub>2</sub> líquido (-196 °C), lo que hace condensar a los volátiles en las paredes del tubo (pero no al He de la purga). Los volátiles atrapados son de nuevo volatilizados por calor y analizados por GC-FPD.

## **Conceptos generales**

El DMS (CH<sub>3</sub>SCH<sub>3</sub>) es un gas producido por la redes tróficas marinas a partir de su precursor DMSP ((CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>S+CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>COO<sup>-</sup>), un compuesto intracelular multifuncional del fitoplancton. El DMS es emitido en gran cantidad del océano a la atmósfera, donde participa en la formación de aerosoles y de núcleos de condensación de nubes, potencialmente afectando al balance radiativo del planeta.

## Equipamiento necesario

(Los números corresponden a diferentes ítems de la Figura 1).

4. Jeringa de vidrio de 10 ml “luer lock” (4).
5. Tubo de teflón (5) para fijar al extremo de la jeringa “luer lock”.
6. Portafiltros (cápsula de filtración).
7. Vial de vidrio de 20 ml (7).
8. Pinzas no contaminadas con NaOH.
9. Tapón gris (*septum*) con recubrimiento interior de silicona (9).
10. Cronómetro.

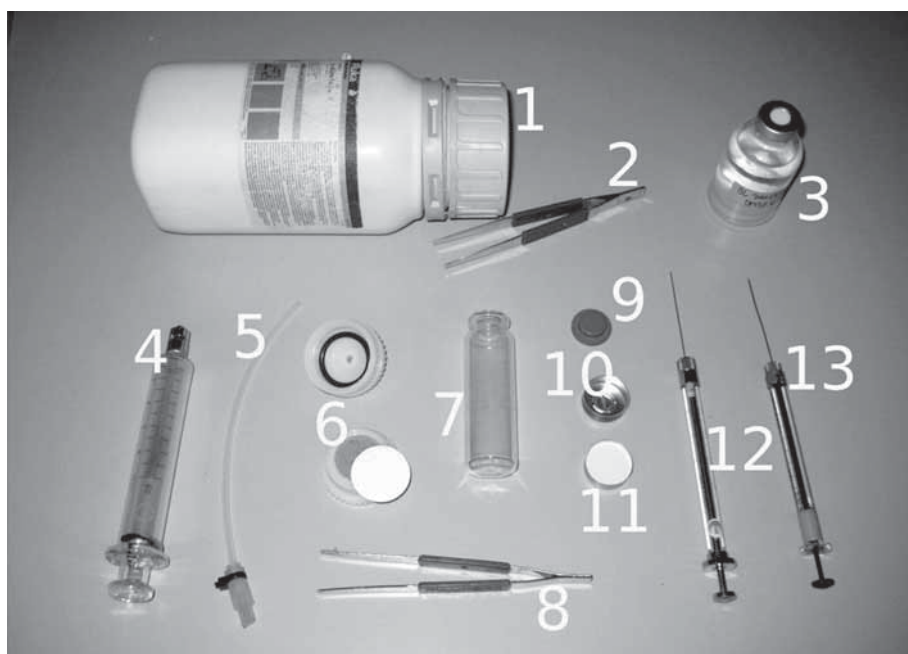


Figura 1. Equipamiento usado para el muestreo, preservación y análisis del DMS(P). Pellets de NaOH (1); pinzas usadas solamente con los pellets de NaOH (etiqueta verde)(2); vial de 40 ml usado para el almacenamiento de las muestras de DMSP (3); jeringa de vidrio de 10 ml con punta luer lock (4); tubo de teflón con adaptador para la jeringa luer lock (5); portafiltros desenroscado, con su junta de goma y un filtro GF/F de 25 mm de muestra (6); vial largo de 20 ml, usado para la purga de muestras (7); pinzas “limpias”, usadas para manipular los filtros y otras cosas que no entren en contacto con el NaOH (8); septum gris, usado en el muestreo y en la purga (9); cápsula de aluminio sin septum (10); septum blanco, usado para las muestras de DMSP (11); jeringa gas-tight, usada en la calibración (12); jeringa gas-tight contaminada con NaOH, usada para el análisis de muestras de DMSP (13) (método no explicado en el presente protocolo).



### *Instrumentos usados para la medición (Figura 2)*

3. Cromatógrafo de gases (GC) con sistema de preconcentración por trampa criogénica.
4. Horno de permeación (contiene un tubo de permeación lleno de patrón de DMS líquido).
5. Generadores de hidrógeno ( $H_2$ ) y aire ultrapuro.

### **Reactivos u otro material fungible**

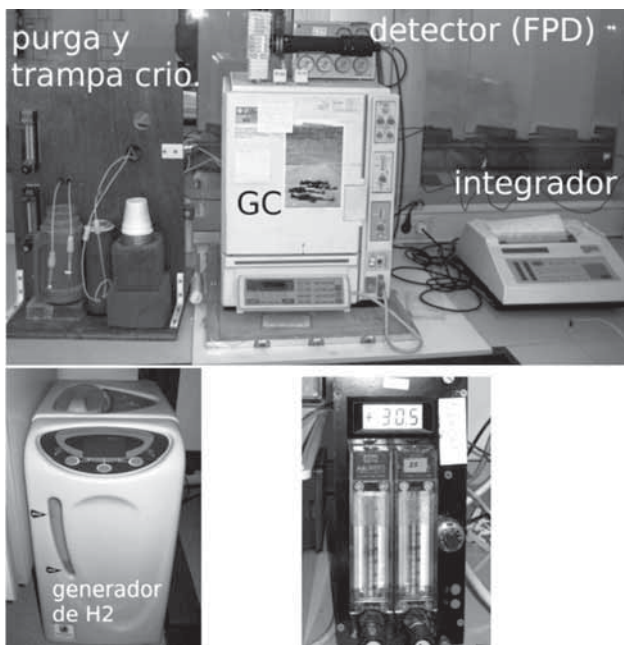
- Filtros GF/F de 25 mm.
- Bombona de helio (He) ultrapuro.

### **Calibración**

#### *Principio del sistema de calibración: el horno de permeación*

Para calibrar el GC, vamos a inyectar en el GC cantidades conocidas de DMS puro gaseoso diluido en He, provenientes de un horno de permeación (Figura 2). El patrón de DMS puro se encuentra en un tubo de permeación, la temperatura del cual se controla mediante un termostato. A temperatura constante (30 °C), dicho tubo libera DMS gaseoso a una tasa

Figura 2. De arriba a abajo y de izquierda a derecha: conjunto formado por el sistema de purga y trampa criogénica, el cromatógrafo, y el integrador; generador de hidrógeno; y horno de permeación, con el display mostrando la temperatura, y los caudalímetros del patrón (no confundir con los de la purga). La ruedecilla a la derecha de los caudalímetros es el potenciómetro, por donde se regula la temperatura del horno de permeación.



constante. Este DMS es diluido en un caudal de He ultrapuro. El caudal de He que circula por la cámara de permeación (que contiene el tubo con DMS) va a determinar la concentración de DMS en esa corriente. Pinchando con las jeringas *gas-tight* (a través de un *septum*) en esa corriente de He + DMS, vamos a tomar cantidades conocidas de DMS, que inyectaremos en el sistema de análisis. Para reproducir lo mejor posible las condiciones de análisis (% de recuperación del analito) inyectaremos el patrón gaseoso en un vial idéntico al que vamos a usar para purgar el agua de mar (ver «Descripción de la técnica»).

### *Protocolo de calibración*

- Comprobar que la temperatura del horno de permeación es la adecuada (30 °C). En caso contrario, ajustarla con el potenciómetro. Se recomienda girar la rueda del potenciómetro lo mínimo posible, porque el sistema tiene mucha inercia, y la temperatura va a tardar varios minutos en estabilizarse. Una lectura entre 29 °C y 31 °C es aceptable.
- Comprobar que el caudal de He del patrón es el adecuado (20 mm, equivale a 18.2 ml/min a la presión de trabajo habitual del GC). En

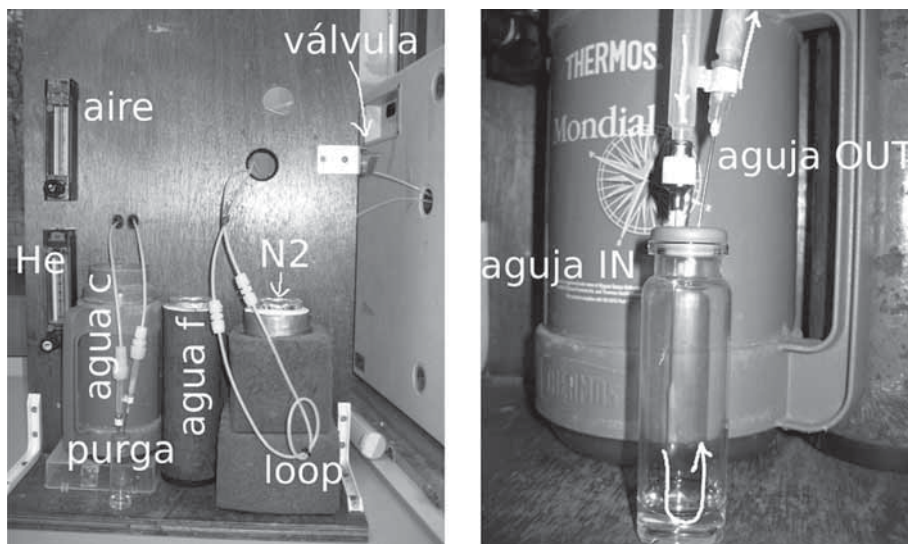


Figura 3. Izquierda: sistema de purga y trampa criogénica. Los caudalímetros de la izquierda corresponden al aire y al He de la purga. Los termos contienen, de izquierda a derecha, agua caliente (calentada con un hervidor tipo “kettle”), agua fría (ambiente) y nitrógeno líquido. Derecha: detalle del vial donde se realiza la purga. El gas de la purga (He) entra por la aguja IN (larga), burbujeando a través del agua y arrastrando con él los volátiles de la muestra, que salen por la aguja OUT (la corta no tiene que llegar NUNCA al agua).

caso contrario, ajustarlo con el caudalímetro y esperar unos segundos antes de empezar a pinchar el patrón. El ajuste se considera cuando la parte inferior de la bola se encuentra sobre la raya de 20 mm.

- Llenar los 3 contenedores (termos) de agua hirviendo, agua a temperatura ambiente y  $N_2$  líquido (Figura 3) respectivamente.
- Abrir el flujo de los gases para la purga (Figura 3): ajustar el flujo de He a 30 mm y el de aire a 60 mm.
- Llenar un vial de vidrio de 20 ml (Figura 3) con un poco (1 cm) de agua MQ y taponarlo con un *septum* gris, vigilando que la boca del vial esté seca.
- Comprobar que la válvula se encuentra en posición P (purga). Sumergir el *loop* en nitrógeno líquido, con cuidado de que las conexiones no lleguen a estar sumergidas.
- Pinchar con la aguja OUT a través del *septum* gris, de forma que la punta de la aguja quede justo por debajo del *septum*. ES MUY IMPORTANTE QUE NO ENTRE AGUA (NI SALPICADURAS) POR ESTA AGUJA.
- Pinchar con la aguja IN (larga) hasta el fondo del vial, de forma que el agua burbujee. Una vez pinchada esta aguja, el caudalímetro del He de la purga tendría que seguir marcando un valor cercano a 30 mm (no menor de 25 mm).
- Pinchar con la aguja gas-tight a través del *septum* (Figura 4) y aspirar un volumen de patrón (ver punto 12 en este apartado más abajo). Inyectar este volumen en el vial de purga a través del *septum* gris. Empezar a contar con el temporizador.



Figura 4. Pinchando con la aguja para patrón (*gas-tight*) en la corriente de He + DMS proveniente del horno de permeación. Se pincha a través de un *septum*, tratando de no dañar el interior de los tubos ni el *septum* mismo.

- Transcurrido el tiempo adecuado (ver punto 13 en este capítulo más abajo), poner la válvula en posición I (inyección). Pasar el *loop* del N<sub>2</sub> líquido al agua hirviendo y, rápidamente, apretar el botón START del integrador. En este momento, el integrador empieza a registrar un cromatograma.
- El pico de DMS va a aparecer en 0.9 minutos (aproximadamente). Una vez pasado el pico de DMS, se puede apretar STOP. El integrador dejará de correr e integrará el área debajo de todos los picos encontrados (imprimiendo el tiempo de aparición y su área correspondiente debajo del cromatograma).
- Antes de proceder al siguiente análisis, pondremos el *loop* en agua fría. De esta forma ahorraremos N<sub>2</sub> líquido, porque provocaremos menos evaporación.
- Los puntos 6 a 12 se repetirán con los siguientes volúmenes de patrón: 50, 100, 200 y 400 µL. En los dos primeros, un tiempo de purga de 2 minutos será suficiente. Para los dos puntos más altos, se recomienda purgar durante 4 minutos. En caso de que fuera necesario añadir un quinto punto a la recta de calibración (800 µL), se recomienda purgar durante 5 minutos. Si la purga ha sido completa, no habrá necesidad de renovar el vial ni el agua que contiene.

### *Comprobaciones habituales*

El horno de permeación requiere estar siempre en funcionamiento y en unas condiciones constantes de flujo y temperatura.

- La **tasa de permeación** se puede comprobar cada pocos meses, pesando el tubo de permeación y anotando la fecha (esto no va a ser necesario durante la Expedición Malaspina).
- La **temperatura** se regula por la rueda (potenciómetro) de la cara frontal del horno de permeación, y aparece en la pantallita (*display*). Aunque es bastante estable, se recomienda comprobarla con una frecuencia diaria (tiene que estar a 30 °C).
- El **caudal de dilución** de He se mide con el caudalímetro de la cara frontal del horno de permeación. La bolita tiene que estar justo encima de los 20 mm (equivalente a un caudal de 18.2 ml/min a la presión habitual de trabajo del GC).

### **Descripción de la técnica**

El análisis de DMS en muestras naturales será muy parecido al protocolo que acabamos de explicar para el patrón. Las diferencias se encuentran en la preparación de la muestra, que explicamos a continuación. La muestra, proveniente de la botella Niskin, se encuentra en un vial de 120 ml.

- Preparamos el material: lavamos el portafiltros con MQ, le colocamos un filtro GF/F (el cual humedecemos con MQ, si no lo está ya) y cerramos el portafiltros enroscando.
- Conectamos el extremo del tubillo de Teflon a la jeringa luer lock de 10 ml (Figura 5).
- Destapamos el vial de 120 ml, y cogemos un pequeño volumen con la jeringa (a través del tubillo) que usamos para lavar la jeringa. A continuación, tomamos unos 7-8 ml de muestra (y cerramos el vial de nuevo con el *septum* gris).
- Quitamos el tubillo del extremo de la jeringa. Con la jeringa mirando hacia arriba, eliminamos burbujas (Figura 5).
- Colocamos el portafiltros en el extremo de la jeringa, y enrasamos a 5 ml (descartando estos 2 o 3 ml, que también sirven para lavar el filtro).
- Vaciamos la jeringa, a través del portafiltros, en el vial de 20 ml usado para la purga. Hay que presionar el émbolo suave pero firmemente (la filtración va a durar unos pocos segundos). Hay que tener cuidado de que el agua se deslice suavemente por la pared del vial. Tapamos el vial rápidamente con un *septum* gris.

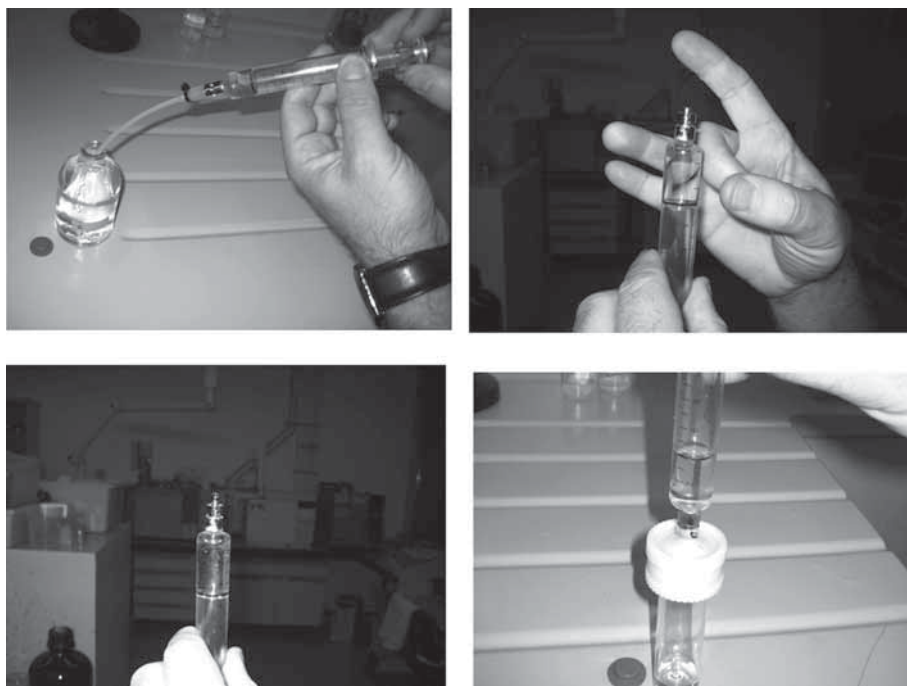


Figura 5. De arriba abajo y de izquierda a derecha: submuestreando del vial de 120 ml; eliminando burbujas; enrasando a 5 ml; filtrando hacia el vial de 20 ml usado para la purga (con su *septum* gris al lado, a punto para taparlo).

- A continuación, el procedimiento es idéntico al de la calibración (apartado de Calibración, punto número 6 sobre comprobación de la válvula). La única diferencia es que no vamos a inyectar patrón (apartado de Calibración, punto número 9 que hace referencia a la Figura 4). Al insertar la aguja IN, empieza la purga y, por tanto, hay que empezar a contar el tiempo de purga con el temporizador.

### *Identificación del pico de DMS*

Podemos identificar el pico del DMS por su tiempo de elución, que en nuestro sistema será de 0.9 minutos. De todas formas, el resto de compuestos de azufre se encuentran, casi siempre, en concentraciones bastante o muy menores, y raramente nos causarán problemas de identificación.

### **Cálculo de los resultados**

ATENCIÓN: el integrador no registra resultados. Se recomienda escribir, al lado de cada pico, su nombre de muestra correspondiente. Cuando la longitud del “pergamino” empiece a ser incómoda, se puede cortar e introducir los datos en el ordenador. Si en el laboratorio hubiera espacio suficiente para un portátil, se pueden introducir los datos al instante. Esto ayuda a saber si las muestras replican razonablemente, y si la calibración es correcta.

### *Cálculo de la recta patrón*

La respuesta del detector no es lineal, sino potencial (aproximadamente cuadrática). En una gráfica *log-log*, la relación entre cantidad de azufre (nmol) y el área debajo del pico (unidades arbitrarias) va a ser lineal.

### *Cálculo de la concentración de DMS en las muestras*

Debido a la respuesta no lineal del detector, las réplicas van a parecer más malas de lo que son realmente cuando vemos las áreas en el integrador. Una vez calculada la concentración real podremos saber el error de la medida.

### **Control de calidad**

#### *Calibración*

La pendiente teórica de nuestro sistema de medida es de 0.5, cosa que se debe a las propiedades del detector. En la práctica, la pendiente se halla normalmente entre 0.4 y 0.65. La ordenada en el origen oscila entre 3.5 y 5,

con valores más altos cuando la pendiente es más alta. La  $R^2$  de la regresión lineal es generalmente  $> 0.99$ . Valores menores indicarán algún problema en la medida.

Se recomienda realizar una calibración semanal. Además, si se ha tenido que parar el instrumento para realizar reparaciones, hay que volver a calibrar.

### *Problemas comunes en la medida*

Errores mayores al 10% (diferencia entre duplicados) van a indicar algún problema. Dejando de lado los problemas derivados de una manipulación inadecuada de la muestra, los problemas habituales son:

- Tiempo de purga insuficiente → hay que incrementar el tiempo de purga. De todas formas, la necesidad de tiempos de purga largos (más de 5-6 minutos) indicará problemas. Probablemente, un caudal de purga insuficiente causado por una obstrucción del flujo y la consiguiente sobrepresión en el sistema.
- Obstrucción de la jeringa OUT → el aerosol formado al burbujear la muestra puede acumular cristales de sal y otras sustancias en el interior de la jeringa de salida de la purga. Por esto, se recomienda lavarla (o sustituirla) cuando se juzgue necesario. Valores de 20 mm o menores en el caudal de purga del He indican que algo obstruye el flujo. Esto puede hacer que el *septum* gris salte, perdiéndose la muestra.
- Fuga a través del *septum* gris → un *septum* se puede pinchar varias veces (entre 5 y 10). Después de cierto número de pinchadas, la elasticidad de la goma no va a ser suficiente para cerrar los agujeros después de la pinchada o para ajustarse bien a la jeringa. En este caso, hay que cambiar de *septum*. Una forma sencilla de comprobar que el *septum* no pierde es ponerle unas gotas de agua MQ encima durante la purga.
- Fugas en las conexiones → se pueden producir en varios puntos, por lo que se recomienda comprobar las conexiones enjuagándolas con un poco de agua jabonosa. Si hay burbujeo, habrá que revisar la conexión (apretar levemente) hasta que desaparezca la pérdida. Se recomienda revisar las conexiones siguiendo la dirección del flujo.

Además de todo lo comentado arriba, los errores tenderán a crecer cuando la concentración de DMS sea más baja ( $< 1$  nM). Esto se puede remediar parcialmente incrementando el volumen de muestra purgado. Sin embargo, llenar demasiado el vial incrementa el riesgo de que el agua (o la espuma que se forma ocasionalmente al burbujear agua de mar) llegue a entrar por la jeringa OUT.



### *Ausencia de señal*

En ocasiones, podemos encontrarnos con un cromatograma totalmente plano (sin el característico “ruido” de fondo), y sin picos. Lo más probable es que la llama del detector se haya apagado. Para resolverlo, abriremos el tapón de la parte superior de la llama, el que está atado por una cadenita, e introduciremos hasta el fondo el aparato que hace chispas, según se ve en la Figura 6. Una pequeña explosión nos indicará que la llama se ha encendido, y recuperaremos la señal.

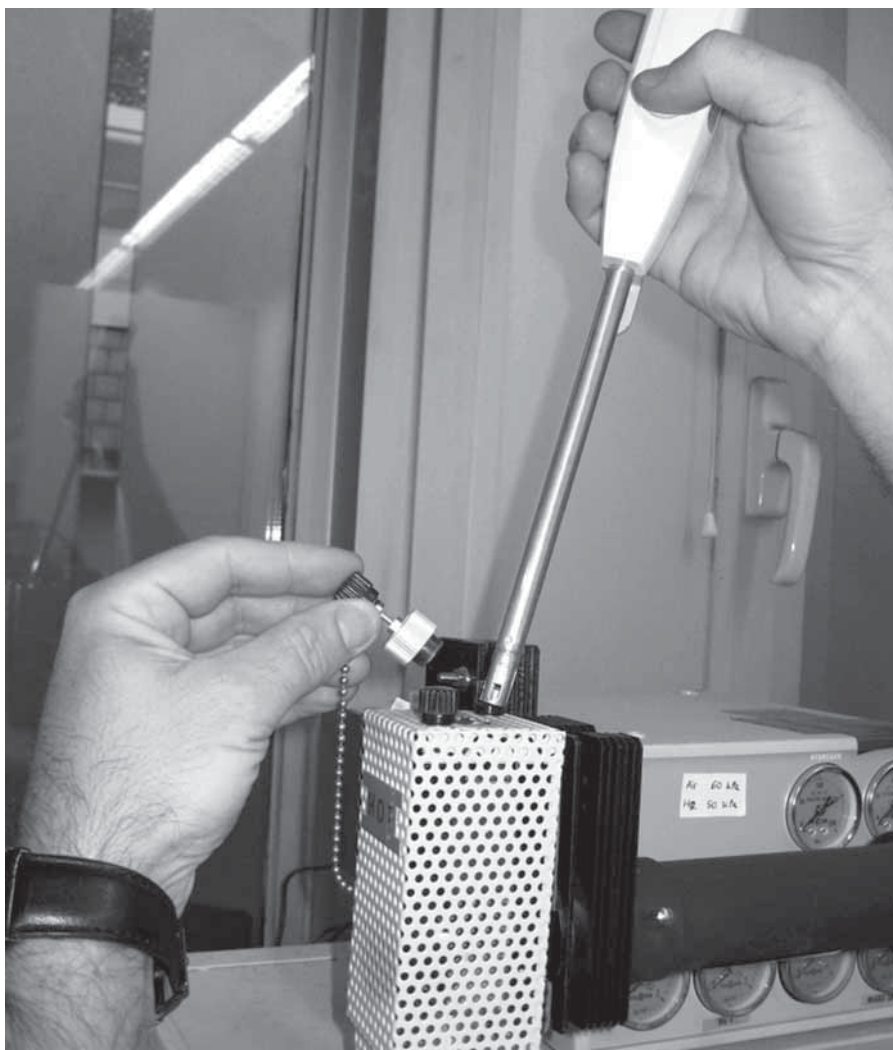


Figura 6. Encendiendo la llama del detector.



# Sistema para el análisis en continuo de la razón $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ y concentraciones del $\text{CO}_2$ atmosférico y del DIC marino

<sup>1</sup>Delgado, A.; <sup>1</sup>Granados, A.; <sup>2</sup>Duarte, C.

<sup>1</sup>*Instituto Andaluz de Ciencias de la Tierra*

<sup>2</sup>*Instituto Mediterráneo de Estudios Avanzados (UIB-CSIC)*

## Finalidad. Campo de aplicación

Analizar las razones isotópicas  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  del  $\text{CO}_2$  atmosférico y disuelto en el agua (parte del Carbono Inorgánico Disuelto, DIC) con el fin de monitorizar los flujos de carbono entre la atmosfera y el océano, y la evolución de la actividad fotosintética en el medio marino a escala de minutos. Además el sistema mide la concentración de  $\text{CO}_2$  con una precisión de  $<200$  ppbv ( $^{12}\text{C}$ ) y  $<10$  ppbv ( $^{13}\text{C}$ ). Los campos de aplicación serían estudios de flujos de carbono, Cambio Global, biogeoquímica de los océanos y de la atmosfera, etc.

## Conceptos generales

Antes de la revolución industrial la concentración del  $\text{CO}_2$  en la atmosfera estaba en torno a 280 ppmV y ahora tenemos unos 385 ppmV. Pero además como el carbón y el petróleo tienen valores relativamente negativos en  $\delta^{13}\text{C}$  -30 ‰ (V-PDB) frente a los típicos valores pre-industriales de (-6,5 ‰ vs V-PDB) (Keeling, 1979; Friedli et ál. 1986), la contaminación antrópica ha dado lugar a una atmosfera con valores  $\delta^{13}\text{C}$  cada vez más negativos (Efecto Suess), rondando en la actualidad un -8,5‰ (V-PDB) (Leuenberger, 2007). Esta negativización señal se está reflejando en el medio marino. Por otra parte, la propia actividad fotosintética del fitoplancton, la respiración, etc. dejan una señal isotópica en el DIC (Dissolved Inorganic Carbon) marino que se podrá monitorizar con este sistema.

Los flujos de carbono han sido monitorizados prácticamente en tiempo real gracias a la combinación de sistemas de equilibrado de gases tipo MiniModule (capilares que incrementan enormemente la superficie de intercambio) con sistemas irga que miden la concentración de  $\text{CO}_2$  (PP System EGM) (Calleja et ál., 2005; Silva et ál., 2005). Ahora además se añade a este circuito cerrado un sistema Picarro (G1101-i) que analiza también la composición isotópica ( $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ ).

### Equipamiento necesario

-El **G1101 Picarro-i** es un analizador en tiempo real que permite monitorizar con gran precisión tanto la concentración ambiental de  $\text{CO}_2$  como la razón isotópica del carbono ( $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ ). El equipo está basado en una técnica que analiza el espectro de absorción de la molécula de  $\text{CO}_2$  cuando incide un láser infrarrojo cercano. Esto permite analizar la concentración y la composición isotópica con una gran sensibilidad, ya que no interfieren otras especies gaseosas. Además el sistema guarda automática y periódicamente los datos en el disco duro interno (Figura 1).



Figura 1. Imagen general del analizador y sistema de calibración.

- **Sistema automático de calibración con 5 vías** de entrada que permite programar que gas entrará en cada momento (Figura 1). Esto facilita la calibración periódica del equipo con aire sintético de concentración y composición isotópica conocida (normalmente se conectan dos botellas con concentraciones de 250 y 500 ppm), pero además dispone de otras tres vías que permiten la entrada de aire atmosférico o aire que ha recirculado por el MiniModule® (sistema de intercambio de CO<sub>2</sub> con el DIC del agua marina procedente del continuo del *Hespérides*).
- **bomba de membrana (A)**, que nos ayuda a tomar la muestra del aire atmosférico (la toma esta en la cubierta superior del *Hespérides*, junto a la sala de mandos) introducirla en el sistema de calibración (conmutador), y este a su vez la conduce hasta el equipo de análisis. Esta bomba funciona de forma continua.
- **bomba de membrana (B)**, se encarga de recircular el aire que está en contacto con el MiniModule® intercambiador de CO<sub>2</sub>. Esto permite que la respuesta sea casi inmediata en el tiempo, de modo que cuando el barco atravesase aguas de concentración de CO<sub>2</sub> y/o composición isotópica diversa sean detectadas sin una deriva de tiempo importante. Esta bomba es opcional, ya que también el propio circuito del sistema contiene una pequeña bomba que está constantemente ingresando aire y expulsándolo en un circuito cerrado. Se ha usado el modelo N86KN de KNF®. La membrana debe ser limpiada periódicamente de partículas de polvo. El síntoma de que la membrana necesita limpieza o está deteriorada es que una vez cerrado el conducto de entrada con el dedo, se observa que continúa saliendo aire por la salida.
- **MiniModule® intercambiador de aire** con el continuo (Figuras 2 y 3). El agua del “continuo” del *Hespérides* se hace pasar por un sistema de membranas que, gracias su gran superficie específica, permite el intercambio rápido y eficiente entre los gases disueltos en el agua y el aire. Por tanto, analizando el aire se obtiene una estima de la concentración y composición isotópica de los gases disueltos en el agua.
- **Trampa desecante**. Los componentes internos del sistema láser (Picarro G1101-i) no deben estar expuestos a la humedad. Sin embargo, la corriente continua de aire (circuito cerrado), que constantemente está equilibrando con los gases disueltos presentes en el agua marina procedente del “continuo”, está saturada en humedad, por lo que se coloca esta trampa intermedia (Figura 2) antes de su entrada en el G1101-i (Picarro®) y PPsystems. Se trata de un cilindro de policarbonato, por lo que se no se debe limpiar con disolventes orgánicos,

que contienen “Drierite”. La drierite contiene cloruro de cobalto, por lo que se debe evitar que genere polvo (este puede provocar alergia en contacto con la piel o al respirarlo). Puede ser reactivada muchas veces mediante calentamiento en estufa a entre 210 °C y 230 °C durante 2 horas, temperaturas elevadas la pueden re-cristalizar, lo que impide que sea reusada al perder su efectividad. Nota: el indicador puede tender a ser más tenue debido a que se reabsorbe en el interior de los fragmentos de drierite (o se desprende como polvo), lo que no significa que la drierite haya perdido su efectividad. La drierite contiene sulfato cálcico que se transforma en yeso en contacto con el agua, de ahí que sean necesarias esas temperaturas (210 °C – 230 °C) para eliminar completamente el agua (y no ligeramente superiores a los 100 °C), así pasará de nuevo a la fase deshidratada (anhidrita).

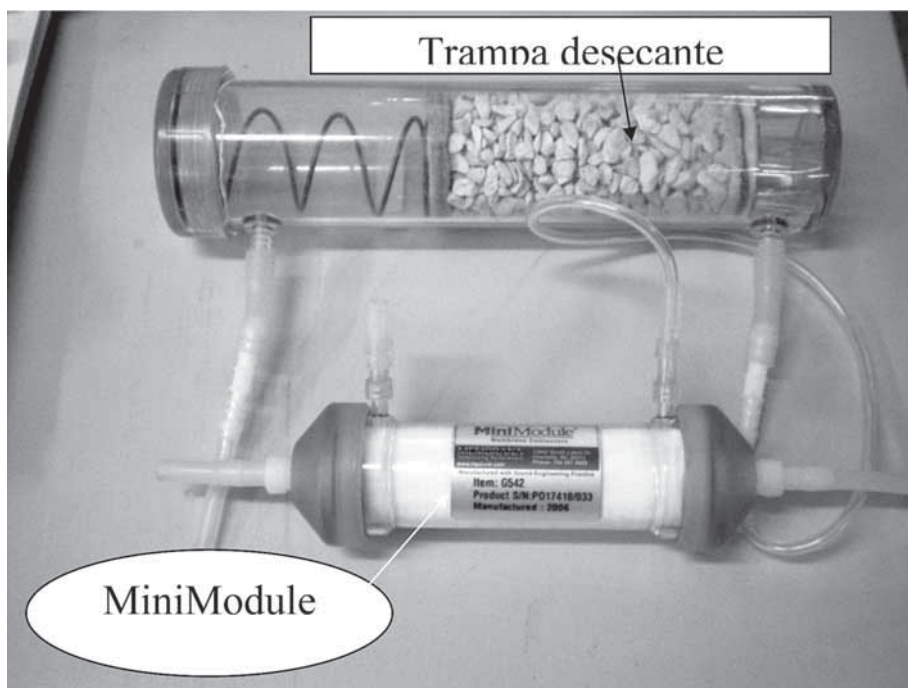
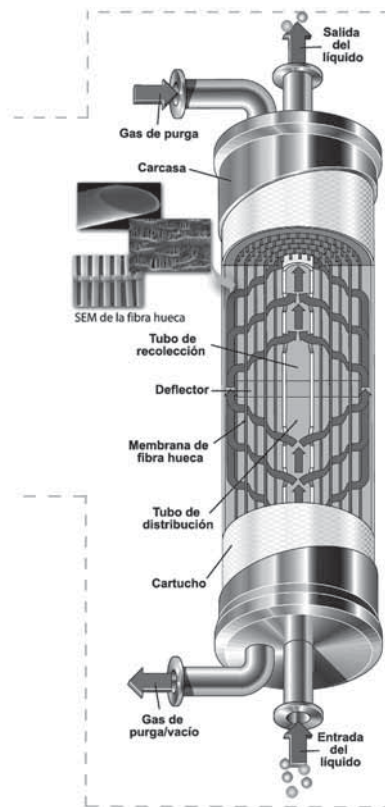


Figura 2. Detalle de la trampa para eliminar la humedad (Drierite®) y del sistema intercambiador de gases (MiniModule® G542).

Figura 3. Esquema del funcionamiento del intercambiador de gases MiniModule® (G542). El agua entra por el circuito en sentido inverso al aire que termina arras-trando (por intercambio) los gases disueltos (ley de Henry). El sistema contiene miles de fibras huecas, por donde circula el “carrier” o gas de purga (en este caso aire) que circula por el circuito, y que debido a la gran superficie específica inter-cambia su concentración de gases con las del líquido que circula en sentido con-trario por el exterior de las fibras. Debido a que el material es hidrófobo el agua no penetra en la fibra, pero sí existe un inter-cambio de gases entre las dos fases (acuosa y gaseosa). Antes de la entrada del agua marina al MiniModule se ha in-corporado un filtro que retiene el material particulado, lo que alarga la vida útil del sistema.



### Reactivos u otro material fungible

- Gases de calibración de concentración y composición isotópica conocida.
- Desecante (Diedrite).
- 100 metros de tubo de poliuretano o de teflón de 6 mm.
- Juntas rápidas y conexiones para tubo de poliuretano de 6 mm.
- Bomba de membrana para el sistema de entrada de muestra.

### Descripción de la técnica

La configuración del sistema consta de los siguientes instrumentos:

- El analizador láser (en este caso fue el Picarro G-11001-i).
- Sistema de Calibración (conmuta entrada de aire equilibrado con el continuo del *Hespérides*, con las entradas gases calibrados, o aire atmosférico de exterior).
- Gases de Calibración.

- Bomba entrada de muestra.
- Intercambiador/desgasificador de gas MiniModule® (G542) (Figura 3).
- Trampa desecante con Drierite.
- Bomba de membrana para recircular el aire con el sistema “MiniModule®”.
- PP Systems (EGM-4 Environmental Gas Monitor for CO<sub>2</sub>).

Se trata de un circuito cerrado que hace circular aire por un sistema de membranas y capilares (MiniModule) que favorece el intercambio de gases entre las dos fases. El agua marina procedente del “continuo” del *Hespérides* (una toma de agua oceánica de superficie en tiempo real durante las 24 horas del día). El aire equilibrado con el agua marina pasa por dos sistemas de medida (Picarro y PPsystem) que analizan concentración de CO<sub>2</sub>,

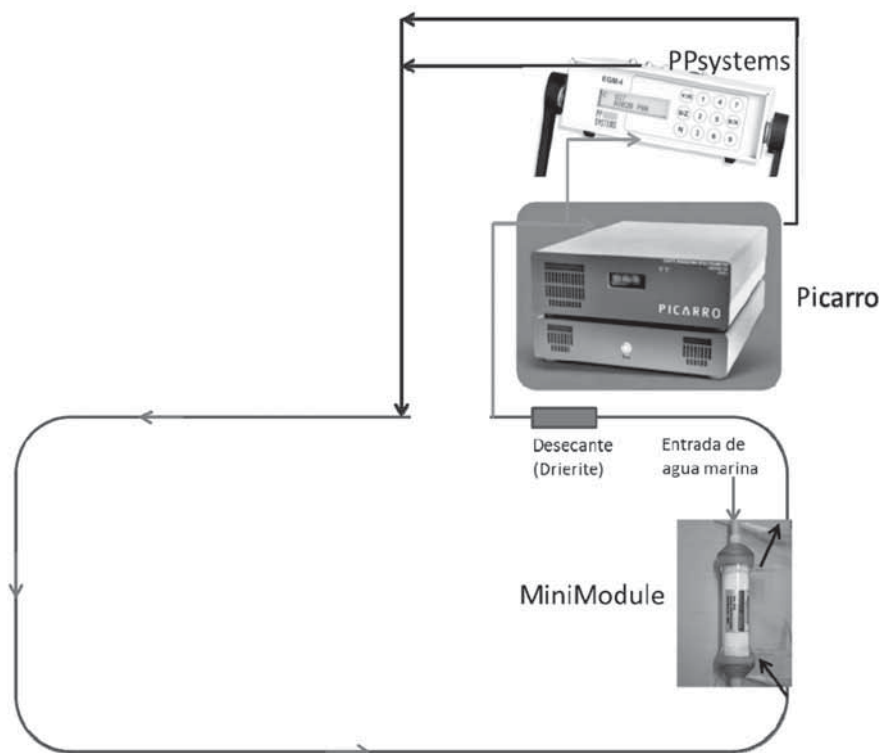


Figura 4. Esquema del funcionamiento del circuito cerrado. El flujo de gas (aire que intercambia con los gases disueltos en agua marina en el MiniModule) se mueve gracias a las bombas de membranas presentes en los dos sistemas de medida (Picarro y PPsystems). Las salidas de ambos sistemas son reconducidas al circuito, de modo que el flujo de gas entre en el MiniModule en sentido opuesto al sentido en que circula el agua. El agua es constantemente liberada al desagüe.



de  $O_2$ , y razones isotópicas  $^{13}C/^{12}C$  del  $CO_2$ . El aire que pasa por estos dos equipos retorna nuevamente al sistema (gracias a unas bombas internas) lo que hace que circule continuamente (Figura 4). Además cuando se considere necesario (o se necesiten respuestas más inmediatas), se puede forzar una circulación más rápida incorporando una bomba de membrana de bajo caudal del tipo N86KN de KNF® (Figura 7) El sistema periódicamente se conecta con una toma de aire atmosférico para monitorizar estos mismos parámetros en la atmósfera (Figura 6). Esta conexión será permanente en los momentos en que el “continuo” se desconecta, por ejemplo en los días previos a la llegada a puerto y hasta después de la salida a alta mar. Lo que permite monitorizar la contaminación en diferentes ciudades. En cualquier caso, en toda la derrota se analizará la concentración de  $CO_2$  atmosférico con un segundo “PPsystems”.

El sistema también cuenta con un conmutador que permite la entrada tanto de patrones de concentración y composición isotópica conocida (Figura 5), como de aire atmosférico o aire equilibrado con el agua marina (ver más detalles en el apartado de calibración).



Figura 5. Conexiones estándar de calibración del sistema.

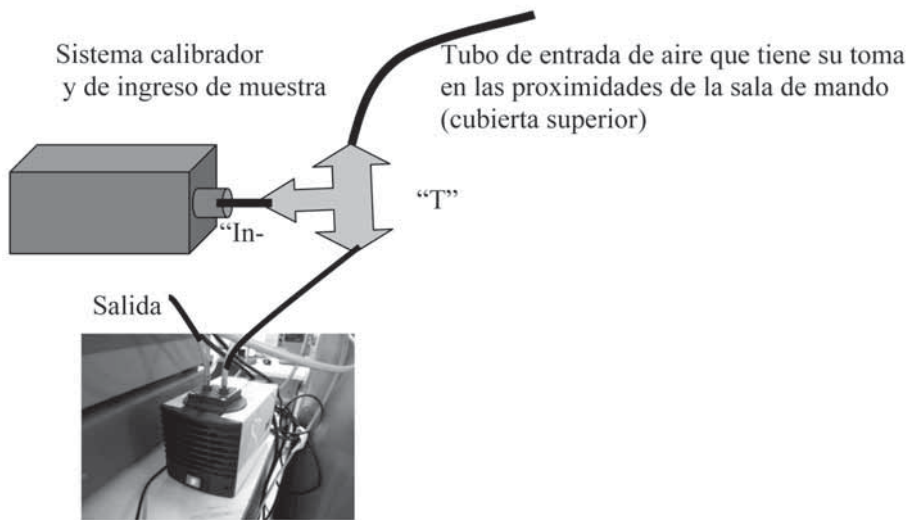


Figura 6. Esquema de toma de muestras de aire.

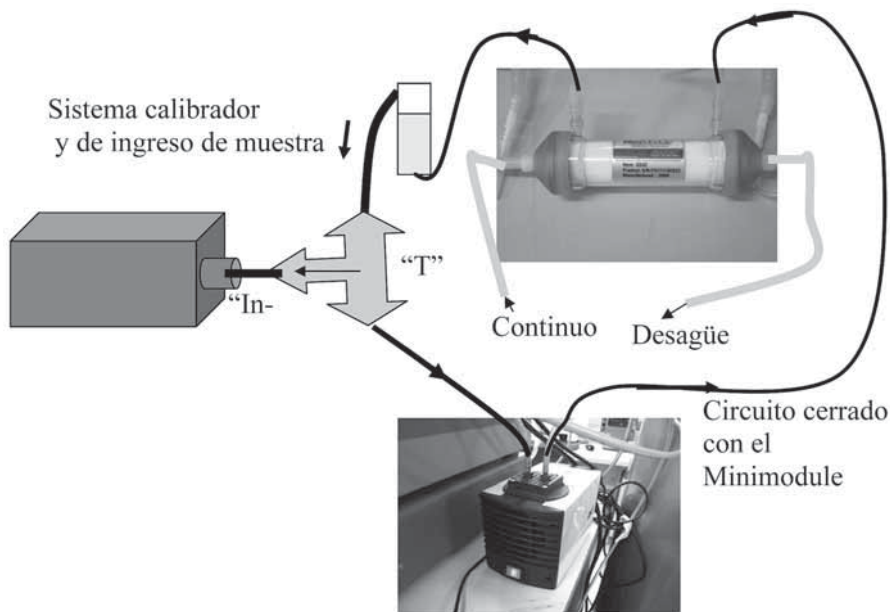


Figura 7. Esquema de toma de muestras de aire en equilibrio con el MiniModule. Se ha incrementado la velocidad con una bomba de membrana intercalada.



## Calibración

Se ha diseñado un sistema de calibración y admisión de muestras que permite controlar en qué tiempos el gas que ingresa en el sistema láser es un patrón o una muestra, y dentro de estas si es aire atmosférico o aire procedente del MiniModule. Esto permite obtener puntos de referencia periódicos que verifiquen el buen funcionamiento del sistema, o en su caso que nos permitan realizar las correcciones oportunas tanto de concentración como de valor isotópico.

Las botellas de los gases patrón están numeradas del 1 al 2, y debemos conectarlas mediante los tubos de poliuretano a las juntas rápidas del sistema de calibración, marcadas como IN y con números que también van del 1 al 2. Debemos abrir las botellas y asegurarnos de que la presión en los reguladores no supera los 0.5 bares (Figura 5).

Por otra parte, el sistema PPsystems cada 40 minutos pasa el aire por una trampa química de “soda-lime” que elimina el  $\text{CO}_2$  del aire (auto calibración), por lo que inyecta aire libre de  $\text{CO}_2$  al sistema, lo que nos permite verificar una pequeña bajada en la concentración de  $\text{CO}_2$  y tiempo necesario para su recuperación; esto último es importante para constatar que el sistema equilibrador funciona correctamente (Figura 8). Cuando los tiempos de recuperación son largos puede ser necesario limpiar con agua destilada y/o descalcificar.

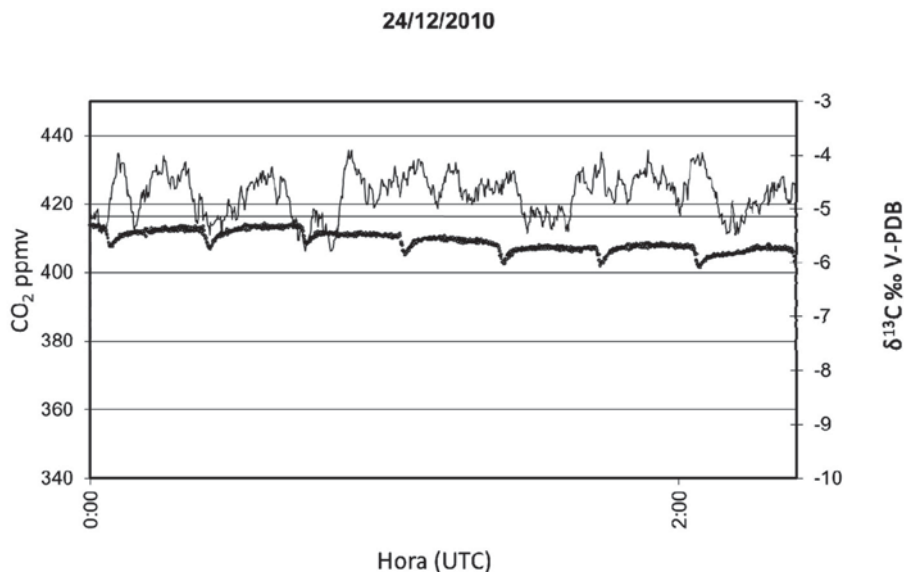


Figura 8. Efecto de la entrada de pequeñas dosis de aire libre de  $\text{CO}_2$  al sistema (autocero del PPsystems) y evolución en su recuperación.

Además de calibrar mediante una entrada directa a los sistemas de medida, también se realizan tests periódicos en los que se llena todo el circuito con el gas calibrado (en nuestro caso de 250 ppm o de 500 ppm), que además presenta una composición isotópica muy diversa al  $\text{CO}_2$  generado por el equilibrio con el agua marina. Esto nos permite verificar la eficacia del intercambiador ya que no solo se llegará a un equilibrio en la concentración sino también en valor isotópico, lo que indicará que el sistema está funcionando correctamente (Figura 9).

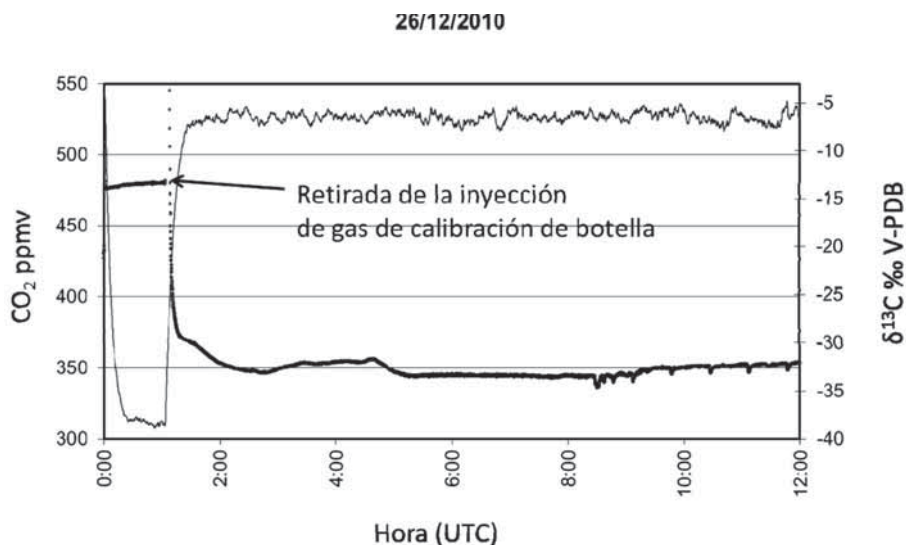


Figura 9. Efecto de la entrada de aire sintético de 500 ppm de  $\text{CO}_2$  (gas de calibración) y evolución hasta la recuperación del equilibrio con el agua marina. La inyección de gas de calibración en el circuito cerrado a las 0:00 sube la concentración de  $\text{CO}_2$  hasta valores de sobre 470 ppm de  $\text{CO}_2$  y baja los valores isotópicos hasta valores  $\delta^{13}\text{C}$  próximos a -38 (V-PDB). Obsérvese como una vez que se conecta el circuito cerrado de nuevo con el MiniModule se recupera rápidamente tanto la concentración de  $\text{CO}_2$  como su valor isotópico, ambos se equilibran con la concentración y valor isotópico del  $\text{CO}_2$  disuelto en el agua marina. En azul la concentración de  $\text{CO}_2$  (ppmV) y en rojo valores  $^{13}\text{C}$  vs V-PDB.

## Datos

El sistema almacena automáticamente los datos analíticos y la hora UTC en el disco duro, lo que permite correlacionarlos con la derrota que lleve el barco en todo momento. Estos resultados serán corregidos con las rectas de calibrado que el sistema realiza y con la cantidad de humedad.

## Referencias

- CALLEJA, M. LL., C. M. DUARTE, N. NAVARRO, S. AUGUSTI. 2005. «Control of air-sea CO<sub>2</sub> disequilibria in the subtropical NE Atlantic by planktonic metabolism under the ocean skin». *Geophys. Res. Lett.* 32, L08606.
- FRIEDLI, H., H. LOTSCHER, H. OESCHGER, U. SIEGENTHALER, B. STAUFFER. 1986. «Ice core record of the <sup>13</sup>C/<sup>12</sup>C ratio of atmospheric CO<sub>2</sub> in the past two centuries». *Nature* 324: 327-328.
- KEELING, C. D., W. G. MOOK, P. P. TANS. 1979. «Recent trends in the <sup>13</sup>C/<sup>12</sup>C ratio of atmospheric carbon dioxide». *Nature* 277: 121-123.
- LEUENBERGER, M. 2007. «To what extent can ice core data contribute to the understanding of plant ecological developments of the past?». En: Dawson, T. E., Siegwolf, R. T. W. (eds.). *Stable isotopes as Indicators of Ecological Change*, 14, pp. 211-232.
- SILVA, J., R. SANTOS, M. L. I. CALLEJA, C. M. DUARTE. 2005. «Submerged versus air-exposed intertidal macrophyte productivity: from physiological to community-level assessments». *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 317: 87-95.



## Extracción de gases disueltos y su almacenamiento para análisis isotópico

Delgado, A.; Granados, A.

*Instituto Andaluz de Ciencias de la Tierra (CSIC)*

### Finalidad. Campo de aplicación

Método de extracción de gases permanentes ( $O_2$ , Ar,  $N_2$ , metano) y algunos compuestos considerados como VOC (Volatil Organic Carbon), y su almacenamiento en viales perforables de 12 ml (Figura 1). La finalidad principal, más que en un estudio cuantitativo, está centrada en obtener cantidad suficiente de gas para su análisis isotópico ( $^{18}O/^{16}O$ ,  $^{15}N/^{14}N$ ,  $^{13}C/^{12}C$  en  $O_2$ ,  $N_2$ , metano y VOC). Los campos de aplicación son el estudio de diversos procesos biogeoquímicos que ocurren en el océano y otros sistemas acuáticos.

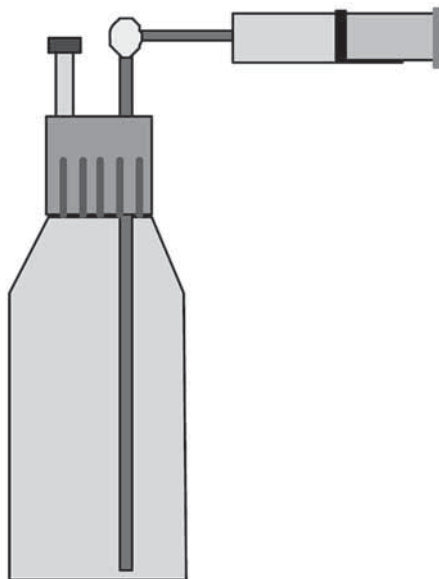


Figura 1. Esquema de la botella de muestreo de gases. Gracias a la aplicación simultánea de vacío y ultrasonidos, los gases se acumulan en un vial perforable que permite la recuperación de estos.

## Conceptos generales

La técnica clásica normalmente usada para la extracción de gases implica el transporte de botellas de Pirex de 300 ml que cuentan con llaves especiales (tipo Louwers-Hapert) para soportar el vacío estático (Emerson et ál. 1991, 1995; Luz et ál., 2002; Luz y Barkan, 2009). Estas ampollas se llenan con 150 ml de agua (a veces todo lo que permite el vacío existente), de modo que los gases disueltos se expanden a los otros 150 ml gracias al vacío existente. Sin embargo, el coste de este tipo de ampollas y el propio sistema de preparación de muestras, limita su uso a perfiles concretos o a muestras esporádicas en campañas oceanográficas cortas. Por otra parte, las ampollas deben estar en vacío durante largos periodos de tiempo, lo que puede traducirse en la entrada por difusión de gases atmosféricos con la consiguiente contaminación de la muestra. Durante los últimos años, se ha comenzado a usar el sistema de “equilibrio del espacio de cabeza” en viales de 20 a 120 ml (Wassenaar y Koehler, 1999; Tobias et ál., 2007), lo que permite analizar la composición isotópica de los gases que se encuentran en mayores concentraciones, pero tienen un uso limitado para metano o VOC.

Con objeto de obtener una mayor cantidad de gas, se han diseñado para la Expedición Malaspina 2010 botellas de uno y dos litros, que permiten extraer los gases disueltos mediante el uso combinado de vacío y ultrasonidos, y almacenarlos en viales de 12 ml. Este sistema tiene la ventaja de que se libera la botella para un nuevo muestreo, lo que permite la preparación de un mayor número de muestras. Con esta técnica se pretende extraer cantidades suficientes de los llamados gases permanentes ( $O_2$ , Ar,  $N_2$ , metano) y algunos compuestos orgánicos gaseosos considerados como VOC (Volatil Organic Carbon), para su posterior estudio isotópico. El uso combinado de ultrasonidos y vacío ya ha sido usado con éxito para la extracción de metano en agua marina (Smith et ál., 1991) y, en general, la agitación y, específicamente, el uso de ultrasonidos facilita la liberación de los gases disueltos.

La mayor ventaja, de esta metodología es que se parte de una mayor cantidad de agua, 1 o 2 litros, frente a los 150-300 ml de las técnicas convencionales y, por tanto, se obtiene una mayor cantidad de gas. Lo que puede resultar espacialmente útil para el análisis isotópico ( $^{18}O/^{16}O$ ,  $^{15}N/^{14}N$ ,  $^{13}C/^{12}C$ ) de algunos compuestos como metano y VOC.

## Equipamiento necesario

- Botella de vacío modificada (ver Figuras 1 y 2).
- Tubo de silicona.
- Viales perforables de 10 ml.
- Jeringa de 60 ml.
- Jeringa de 15 ml.
- Agujas con doble punta.
- Agujas 20 G.



Figura 2. Botella usada en la campaña de intercalibración Malaspina en mayo de 2010. Tras realizar una depresión de 50 ml con la jeringa, se aplican ultrasonidos; a los 40 segundos ya habrán pasado a la jeringa unos 40 o 50 ml de agua (generando el vacío correspondiente en la botella), por lo que se cierra la llave amarilla y continúa el tratamiento de ultrasonidos hasta un total de 5 minutos, de modo que en la botella queda una depresión que da lugar a que los gases disueltos se acumulen en la parte superior (donde se encuentra un vial perforable que permite su posterior recuperación). El proceso de desgasificación se acelera con el tratamiento de ultrasonidos.

### Reactivos u otro material fungible

Agua Milli-Q (desgasificada), agujas, jeringas, viales.

### Calibración

La técnica se calibra en laboratorio partiendo de agua con gases disueltos cuya composición isotópica es bien conocida y sometidos al mismo proceso.

### Descripción de la técnica

#### *Consideraciones previas*

La toma de muestras para el estudio isotópico de gases debe ser una de las primeras, ya que los gases a medida que pasa el tiempo y con el incre-

mento de temperatura pueden migrar a la parte superior de la botella Niskin. En cualquier caso, debería tomarse antes de que la botella Niskin se vacíe hasta su mitad.

Previamente se deben preparar viales, etiquetas, etc. y tener disponible un par de litros de agua Milli-Q ya desgasificada (con el mismo procedimiento que se describe más adelante). De modo que no se pierda tiempo y, una vez recogidas las muestras, se pueda actuar con la máxima celeridad en su preparación.

### *Toma de muestra*

1. Llenar la botella mediante un tubo de silicona que vierta el agua de la botella Niskin directamente en el fondo, para así evitar que el agua se agite lo menos posible (Figura 3).
2. Por otra parte, conectar el tubo de silicona al punto en que se conecta la jeringa. Purgar el agua existente con el tubo hacia arriba y enroscar el tapón sin desconectar la salida de agua de la botella Niskin (Bloque B, Figura 3-1). Abrir el tapón del vial y dar algunos golpecitos en el suelo de modo que cualquier gas ocluido en el tapón salga arrastrado por el agua.
3. Aun saliendo agua por el vial, se cierra con firmeza, procurando que no quede ninguna burbuja. El tapón del vial tendrá un solo uso y se tirará después de todo el proceso.
4. Es conveniente comenzar por las botellas menos profundas (mayor temperatura) para que así, mientras tanto, se eleve algunos grados la temperatura de las botellas más profundas (más frías). Si se va a tardar más de 12 horas en realizar el proceso, guardar las botellas procedentes de cada una de las botellas Niskin en cámara frigorífica, a unos 4 o 5 °C, hasta que le llegue el turno de la extracción de los gases.
5. En general, se procederá a la extracción de los gases de forma inmediata o pasadas una o dos horas, comenzando por las aguas más superficiales.

### *Extracción de los gases*

6. Con ayuda de la jeringa de 60 ml se extraen 50 ml de agua, lo que está provocando una depresión equivalente dentro de la botella. Inmediatamente, y antes de cerrar la llave –con la situación de la otra mano haciendo la depresión de 50 ml (Figura 4)– encender los ultrasonidos. Justo en ese momento (tarda unos 30 o 45 segundos) debido al desprendimiento de los gases parece producirse un incremento momentáneo del volumen, por lo que termina de llenarse la jeringa de agua. Pasados entre 40 – 60 segundos ya no en-



tra más agua en la jeringa, por lo que se puede cerrar la llave. Se observará que rápidamente aparecen las burbujas adheridas a las paredes (Figura 5).

7. Una vez cerrada la llave, se deja que continúen actuando los ultrasonidos hasta un total de 5 minutos.
8. Finalizada la serie de ultrasonidos, se retira la botella y, sobre la mesa de laboratorio (o mejor en el suelo), se dan unos golpecitos para acumular las burbujas pequeñas en una gran burbuja en la parte superior que se conducirá hasta el vial pegado al tapón.
9. Se extrae la burbuja con la ayuda de una jeringa de 20 ml que está llena de agua Milli-Q, previamente desgasificada con el mismo método. El proceso consiste en inyectar agua para así facilitar la extracción del gas acumulado hacia la misma jeringa (Figura 6). Dejar una pequeña cantidad de agua (2 o 3 ml) en la jeringa para que constituya una barrera entre el gas acumulado en la jeringa y el aire exterior (para evitar visualmente que se produzca cualquier contaminación). **Precaución:** procurar que la aguja de la jeringa esté firmemente unida a ella, ajustarla bien antes de realizar todo el proceso.
10. Inyectar el gas que se ha recuperado con la jeringa en un vial de 12 ml que contiene agua Milli-Q (previamente desgasificada). Para ello se perfora el tapón con una aguja (mantener desde ese momento el vial boca abajo en todo momento), de modo que al inyectar el gas contenido en la jeringa se salga el agua del vial por sobrepresión. Cuando quede aproximadamente 0.5 ml de agua se retira cuidadosamente la aguja (con el tapón aún boca abajo); y se procede a rellenar el siguiente vial (si es que se ha recuperado más gas de la botella). **IMPORTANTE:** la aguja que atraviesa el vial (dedicada a expulsar el agua) nunca puede estar en contacto con el gas (ya que comunicaría el gas extraído con el aire de la calle, contaminando la muestra), siempre debe permanecer en la parte líquida, de modo que el gas se acumule por encima del agua, y esta constituya su aislante.
11. Normalmente con una tanda de ultrasonidos será suficiente. Pero cuando se pretende una recuperación de gases cuantitativa o se sospecha que ha quedado una cantidad importante de gas disuelto sin extraer, se repite el procedimiento una o dos veces más desde el paso 8. Generando de nuevo una depresión de 50 ml, se aplican ultrasonidos, etc. Normalmente, a la tercera vez ya costará bastante obtener más gas, por lo que termina el proceso.
12. Dependiendo del tipo de aguas, se obtiene entre 5 y 15 ml de gas (a partir de 2 litros de agua marina). Pero si la cantidad de gas disuelto es alta se pueden llenar varios viales. A cada vial, además del etiquetado correspondiente a la botella Niskin en cuestión, se

le añadirá el sufijo “1” si fue el primero en llenarse, “2” si fue el segundo, etc.

13. Los viales se almacenan boca abajo, de modo que el agua quede en contacto con el tapón. En ambiente oscuro y a temperatura ambiente. Debido a que el ambiente será más frío, y se contraen el pírrex y los gases, es conveniente una vez retirada la aguja que desagua el vial, terminar por inyectar 0.5 ml más de gas de modo que exista una pequeña sobrepresión. Añadir para su conservación 10 microlitros de solución saturada en  $\text{HgCl}_2$ .

### Cuadro sinóptico de la técnica

Se resumen 8 pasos importantes a seguir:

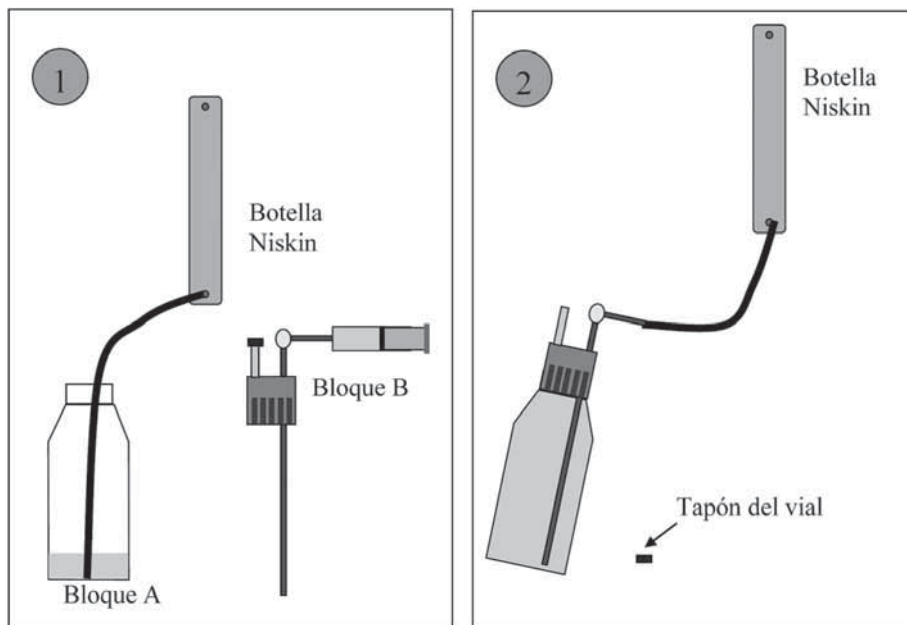


Figura 3. Esquema de los pasos a seguir. (1) llenar la botella colocando el tubo de silicona en el fondo para evitar la agitación del agua. (2) Una vez llena la botella colocar el bloque del tapón (el agua de la Niskin sale ahora por el vial, momento en que se expulsan los gases que puedan quedar ocluidos en el tapón). Cerrar con firmeza el tapón de la botella (después se hará vacío y se debe impedir la entrada de aire). No debería quedar aire, pero conviene dar unos golpecitos y girar por si queda alguna burbuja, para que salga. En ese momento incluso se puede perder algún gas (sobre todo de aguas profundas, que viene con más presión), pero es preferible perder alguna burbuja a que quede aire ocluido en el tapón.

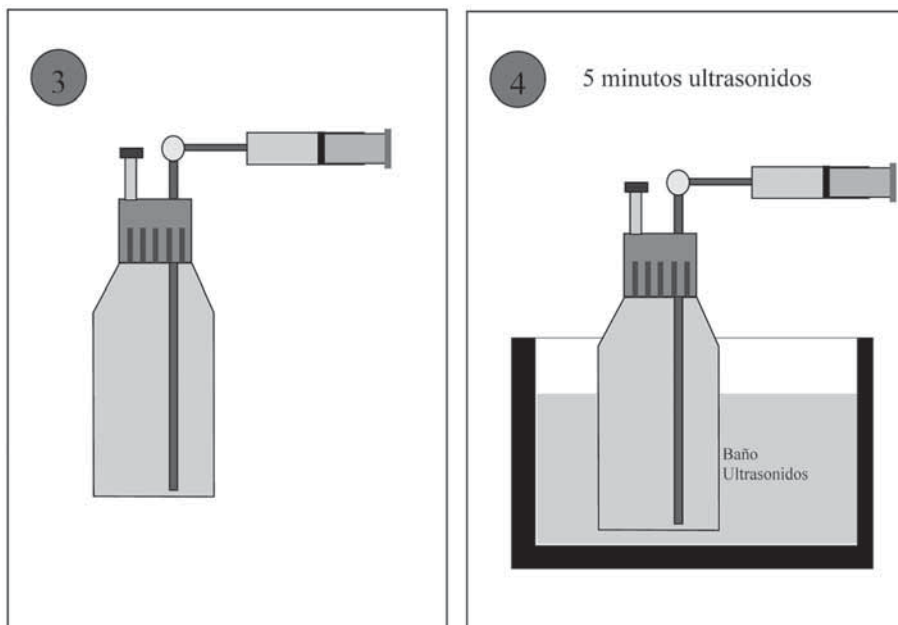


Figura 4. Esquema de los pasos a seguir. (3) Se introduce la botella en el baño de ultrasonidos y con ayuda de la jeringa de 60 ml se genera vacío en la botella. Para ello se abre la llave amarilla y, a continuación, se expande la jeringa hasta los 50 ml (cuesta trabajo), en ese momento se conectan los ultrasonidos, y sin relajar la jeringa, no se cierra la llave amarilla hasta pasados 40 segundos (estos 40 segundos de ultrasonidos ayudan a que se llene los 40-50 ml de agua de la jeringa). De ese modo, se ha generado un vacío en la botella, que da lugar a que el gas disuelto en el agua se libere formando burbujas que obviamente tienden a ir para arriba y acumularse en el vial perforable. (4) La sonicación continúa hasta los 5 minutos. Tras este paso aparecerán muchas más burbujas.

Figura 5. Tras el tratamiento con ultrasonidos aparecen numerosas burbujas. Estas deben conducirse girando la botella (y dando algunos golpecitos) hacia el vial perforable.



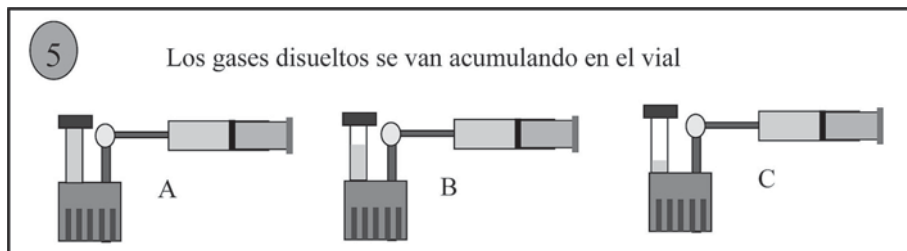


Figura 6. Tras el tratamiento con ultrasonidos aparecen numerosas burbujas. Estas deben conducirse girando la botella (y dando algunos golpecitos) hacia el vial perforable. A los pocos segundos o minutos (según la práctica del operador), se observa como el gas liberado se concentra en el vial (tendencia A, B, C). Lo que permitirá su extracción posterior.

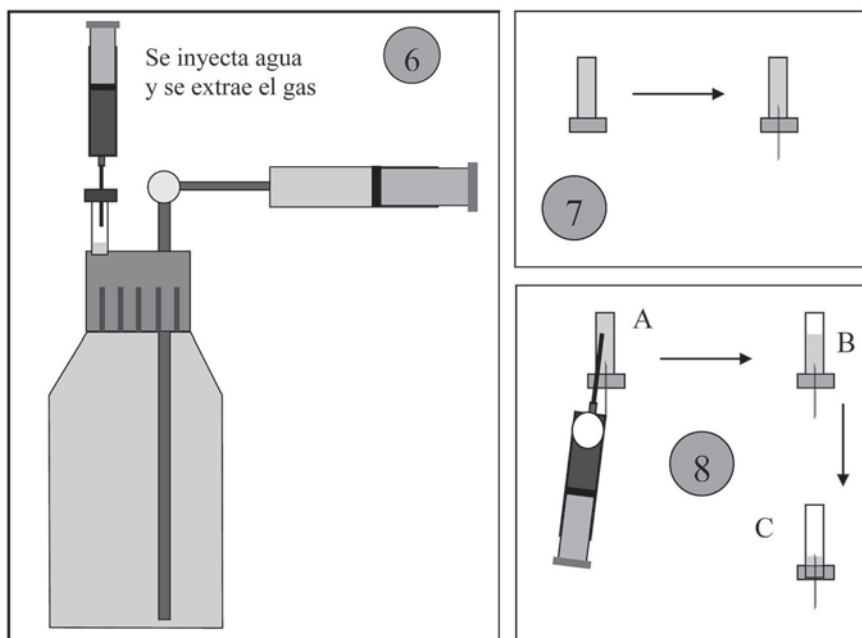


Figura 7. Una vez que el gas se ha llevado hacia el vial perforable, se extrae mediante una jeringa de 20 ml (6). La jeringa se habrá llenado de agua Milli-Q ya desgasificada con una botella similar. El proceso consiste en inyectar agua y cuando quede sobre 2-3 ml de agua se extrae el gas. Previamente ya se habrá preparado un vial de 12 ml que está lleno de agua Milli-Q desgasificada (7). A continuación se inyecta el gas en el vial (8), lo que da lugar a que se desplace el agua y se salgan tantos mililitros de agua como mililitros de gas se han inyectado. Cuando la cantidad de gas disuelta es alta, puede ser necesario llenar un segundo vial.

## Cálculo de los resultados

Los viales son pesados antes y después, por lo que se calculan aproximadamente los ml de gas extraído. Pero como se ha indicado anteriormente, esta metodología está centrada en obtener muestras de gas para su posterior análisis isotópico. Por lo que será, ya en el laboratorio, cuando se apliquen diferentes metodologías (“purge and trap”, espacio de cabeza estático, solid-phase microextraction “SPME”, etc.). Para analizar las diferentes razones isotópicas que se pretenden estudiar.

## Control de calidad

Las botellas son muy duras (incluido el tapón de teflón) y específicas para que aguanten vacíos superiores al que se aplicará, sin embargo el tapón puede no apretarse adecuadamente, lo que se traduciría en que continuamente se está succionando aire atmosférico (y se obtienen rendimientos de gas anormalmente altos). Ese sería el mismo caso de que se abra algún canalículo que permita la entrada de aire por alguna junta o por el vial perforable. Sin embargo, esos problemas suelen ocurrir al inicio. Después solo hay que tener precaución de no deteriorar la rosca del tapón. El resto de material es fácilmente sustituible, jeringas, tubos, etc.

## Referencias

- EMERSON, S., P. D. QUAY, C. STUMP, D. WILBUR, M. KNOX. 1991. «O<sub>2</sub>, Ar, N<sub>2</sub> and 222Rn in surface waters of the subarctic ocean: net biological O<sub>2</sub> production». *G. Biogeochem. Cyc.* 5: 49-69.
- EMERSON, S., P. D. QUAY, C. STUMP, D. WILBUR, R. SCHUDLICH. 1995. «Chemical tracers of productivity and respiration in the subtropical Pacific Ocean». *J. Geophys. Res. Oc.* 100: 15873-15887.
- LUZ, B., E. BARKAN. 2009 «Net and gross oxygen production from O<sub>2</sub>/Ar, <sup>17</sup>O/<sup>16</sup>O and <sup>18</sup>O/<sup>16</sup>O ratios». *Aquat. Microb. Ecol.* 56: 133-155.
- SCHMITT, M., E. FABER, R. BOTZ, P. STOFFERS. 1991. «Extraction of methane from seawater using ultrasonic vacuum degassing». *Analyt. Chem.* 63: 529-531.
- TOBIAS, C. R., J. K. BOHLKE, J. W. HARVEY. 2007. «The oxygen-18 isotope approach for measuring aquatic metabolism in high-productivity waters». *Limnol. Oceanogr.* 52: 1439-1453.
- WASSENAAR, L. I., G. KOEHLER. 1999. «An on-line technique for the determination of the delta O-18 and delta O-17 of gaseous and dissolved oxygen». *Anal. Chem.* 71: 4965-4968.



# Composición isotópica del vapor atmosférico

Granados, A; Delgado, A.

*Instituto Andaluz de Ciencias de la Tierra (CSIC)*

## Finalidad. Campo de aplicación

Analizar la composición isotópica (D/H,  $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ ) del vapor de agua atmosférico. Los campos de aplicación son climatología, paleoclimatología e hidrología.

## Conceptos generales

La mayor parte de las masas nubosas del planeta tienen su origen en la evaporación de agua oceánica a medias y bajas latitudes, especialmente sobre el ambiente marino. Ahí comienza su primer fraccionamiento isotópico, después a lo largo de todo el ciclo hidrológico continúan produciéndose procesos de evaporación, pero especialmente de precipitación en diferentes latitudes. Los isótopos de ambos elementos están sujetos a los mismos procesos físicos, por lo que el fraccionamiento isotópico de los isótopos del oxígeno ( $^{18}\text{O}$ ,  $^{17}\text{O}$ ,  $^{16}\text{O}$ ) e hidrógeno (D, H) es paralelo, lo que da lugar a que la composición isotópica el agua de precipitación de todo el planeta suele adaptarse bastante bien a la siguiente ecuación:

$$\delta\text{D} = 8 * ^{18}\text{O} + 10 \text{ (Craig, 1961)}$$

El término independiente, se ha llamado exceso en deuterio “*d*” que suele ser de +10 en la mayor parte de las aguas de precipitación. Sin embargo, procesos de evaporación de aguas superficiales (lagos, ríos, etc.) tiende hacia valores menores de 10 e incluso negativos cuando la evaporación acumulada ha sido importante (Rozanski y Sonntag, 1982; Schoch-

Fisher et ál. 1994). Este parámetro también es importante para seguir la trazabilidad del vapor de agua atmosférico y detectar su origen transpiración de plantas, evaporación de aguas superficiales, etc. (Moreira et ál., 1997; Yepez et ál., 2003). Finalmente, resulta también muy importante para interpretar correctamente la información isotópica de los sondeos de hielo de la Antártida y Groenlandia. De hecho, se piensa que en el pasado, en épocas glaciares, y dependiendo del porcentaje de humedad sobre el medio marino, el exceso en deuterio “*d*” pudo ser muy diferente del actual. Sin embargo, a pesar de su importancia son pocos los trabajos en los que se ha medido la composición isotópica del vapor atmosférico en el medio oceánico (Craig y Gordon, 1965; He et ál., 2001), de ahí el interés de incorporar a la Expedición Malaspina este tipo de análisis.

### Equipamiento necesario

El DLT-100 es un nuevo sistema que permite analizar en tiempo real tanto la concentración de vapor de agua atmosférico como las proporciones isotópicas del oxígeno e hidrógeno del agua (Figura 1).

El equipo está basado en una técnica novedosa que analiza el espectro de absorción de la molécula de H<sub>2</sub>O cuando le hacemos incidir un láser infrarrojo cercano. El gas es distribuido en una cavidad de medición óptica y tiene un monitor de alta precisión para la longitud de onda, lo que nos asegura un alto control en el espectro de absorción. Este sistema ha sido complementado con un sistema automático de calibración. El sistema guarda automática y periódicamente los datos en el disco duro interno.

El equipo está conectado a un sistema de ingreso de muestra-calibración, diseñado específicamente para esta campaña, que permite que entre en determinado momentos aire atmosférico sobre el que se quiere medir la composición isotópica de su vapor de agua, y por otra parte, vapor de agua procedente de los patrones. El aire atmosférico ingresa constantemente desde la cubierta del *Hespérides* mediante una bomba de membrana (Figura 2).

### Reactivos u otro material fungible

La técnica requiere para su correcto funcionamiento de patrones de calibración de composición isotópica conocida. Estos patrones de agua se han preparado en el laboratorio para que estén centrados en el rango de valores que se espera para el vapor de agua atmosférico.

Además la técnica requiere el siguiente material fungible:

- Tubo de TEFLON-PFA 1↔58 x 3↔18 mm.
- Conexiones y racores swagelok para tubo (varias dimensiones).
- Septum TCS de 6 mm.
- Jeringas Hamilton 1.2 microlitros.
- Agua destilada.



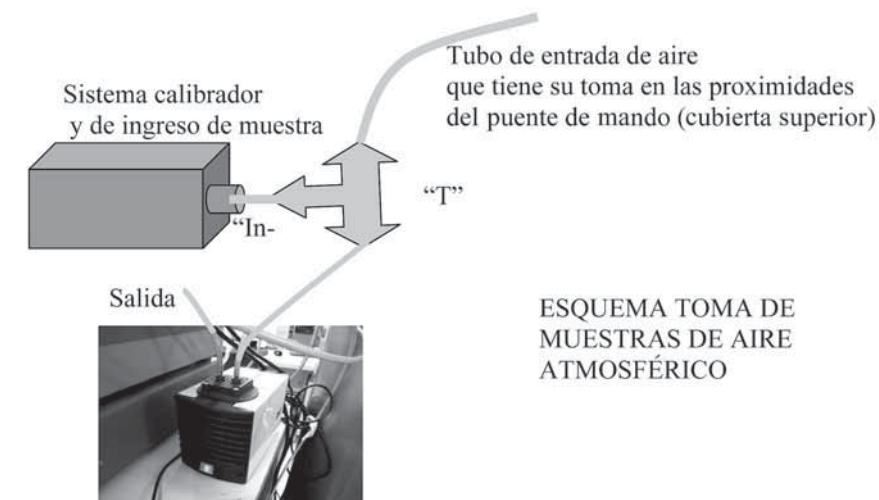
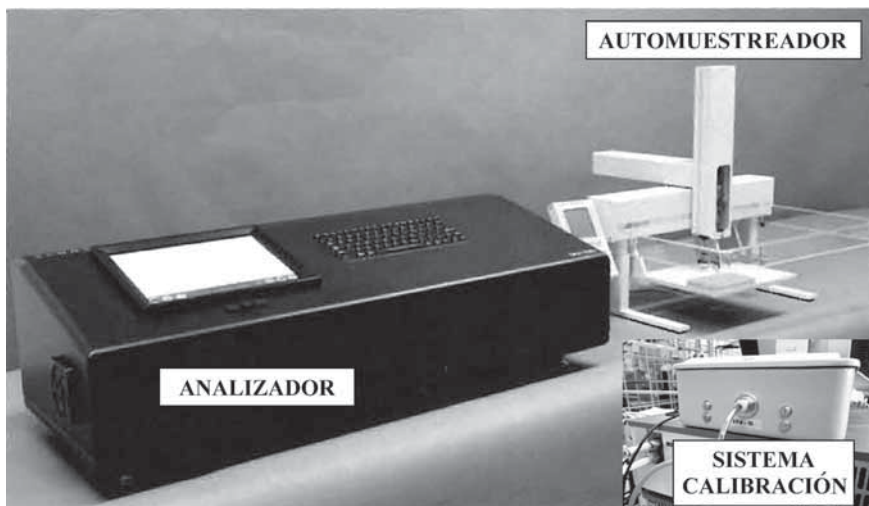


Figura 1. Imagen general del analizador y automuestreador, y esquema del circuito para introducir aire atmosférico en el sistema.

### Descripción de la técnica

El equipo consta de los siguientes instrumentos (ver Figura 1):

- El analizador láser DLT-100.
- Automuestreador TCT.
- Sistema de Calibración y de ingreso de muestra.

Para completar el montaje del sistema vamos a seguir los siguientes pasos:

- 1º Conectamos el tubo de teflón de 3/8" que comunica la bomba de vacío con el Analizador LWIA en la posición "TO EXT. PUMP" (ver Figura 2).
- 2º Conectamos el desecador de gas compuesto por un bloque relleno de drierite al analizador en la posición "DRY GAS INLET", usando el tubo de teflón adecuado (ver Figura 3).
- 3º Conectamos el cable calentador del bloque de inyección, al analizador en la posición "TO HEATER". Y conectamos el tubo de teflón de 1/8" con filtro incorporado, entre el analizador y el bloque calefactor (ver Figura 4).
- 4º Por último, conectamos el cable RS232 que comunica el analizador con el sistema de calibración.

## Calibración

La técnica requiere para su correcto funcionamiento de los patrones de calibración de composición isotópica conocida. Al sistema de medida le hemos añadido un sistema automático de calibración, ya descrito detalladamente en el apartado anterior. Este sistema está desarrollado para intro-

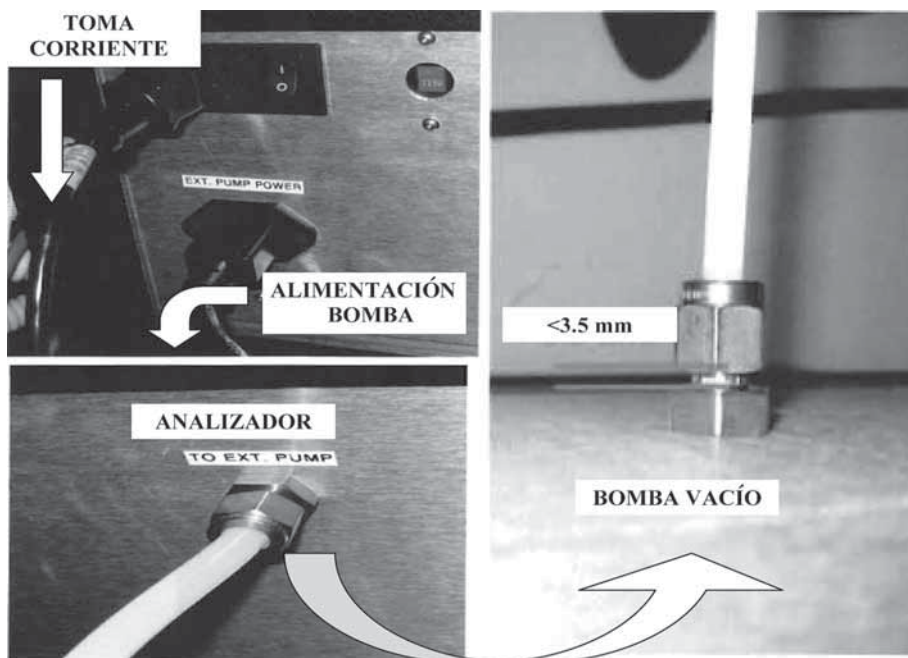


Figura 2. Conexiones alimentación y vacío.

ducir periódicamente alícuotas de patrones de valor isotópico conocido; y a posteriori, los datos serán tratados adecuadamente para obtener las rectas de calibrado periódicas que nos den unos buenos resultados definitivos.

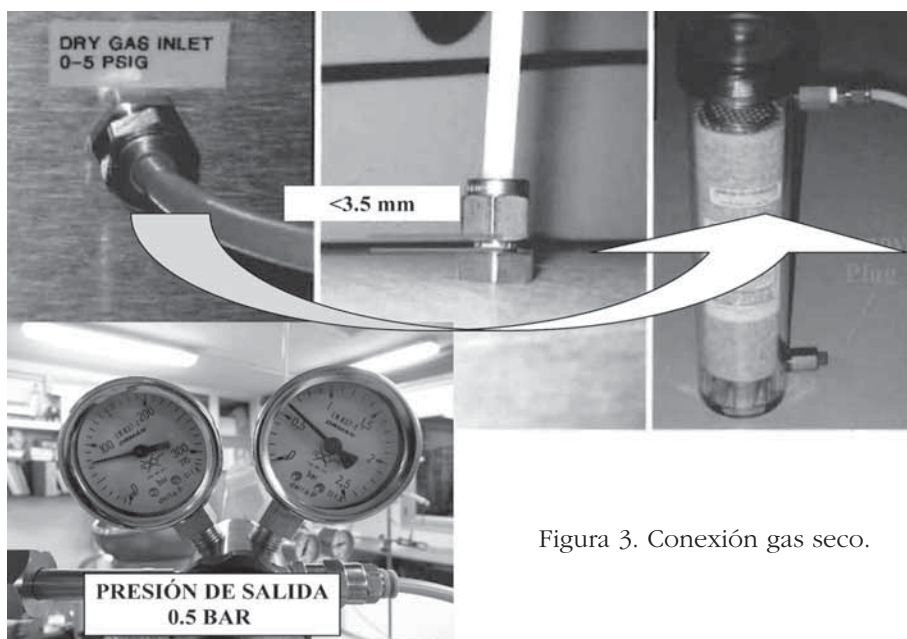


Figura 3. Conexión gas seco.

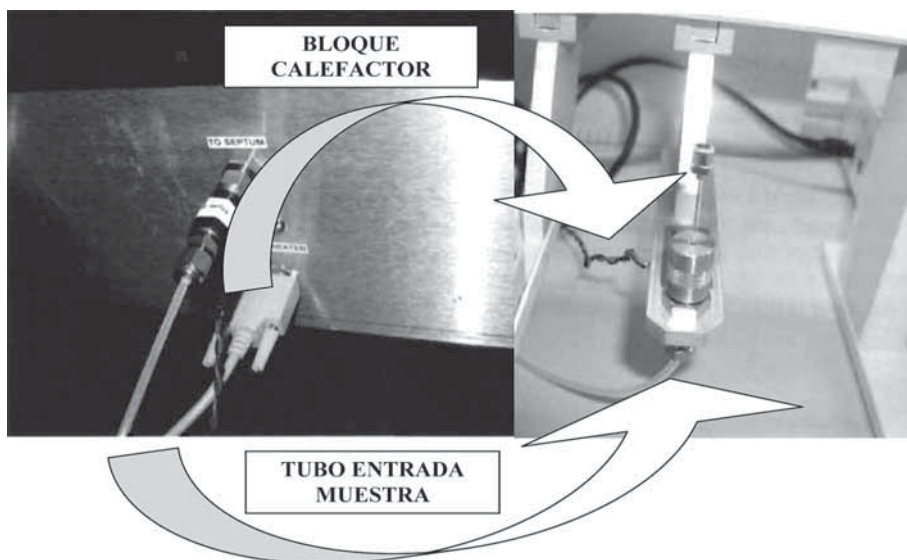


Figura 4. Conexiones del analizador y el inyector.

## Mantenimiento

A) Cambio de septum y limpieza del tubo de inyección, y limpieza de la jeringa de inyección (una vez a la semana):

### *Cambio de septum:*

El septum del bloque del autoinyector, se cambia cada siete días. Es MUY IMPORTANTE seguir exactamente estos pasos ya que en caso contrario el equipo se averiará. El proceso a seguir es el siguiente:

- En la pantalla principal, aparece la tecla para poder entrar en la pantalla de configuración para realizar el cambio de septum. Para ello presionamos "SETUP"; y nos aparece una nueva pantalla con un faldón, en donde podemos ver la ventana "CHANGE SEPTUM".
- Automáticamente aparece una nueva pantalla, marcamos inicio "initiate", y esperamos que se nos ilumine la tecla "Ready for new septum", **esto suele tardar unos cinco minutos**, ya que es el periodo en el que el analizador se pone a presión atmosférica y pierde el vacío.
- Una vez que está listo para cambiar el septum, debemos de desenroscar la tuerca donde el septum está alojado. Debemos de tener cuidado, pues la temperatura del bloque de inyección es de unos 70 °C. Eliminamos el antiguo septum, y colocamos uno nuevo, asegurándonos que la cara del septum que tiene teflón, queda mirando hacia la zona térmica (para abajo). Para ello nos ayudamos de una aguja intercambiable, que usamos para centrar el septum en su posición correcta. Una vez cambiado el septum, colocamos la tuerca en el bloque calefactor y la apretamos con firmeza, pero a mano, y sacamos y metemos varias veces la jeringa, para asegurarnos que el septum queda un poco perforado (facilita la entrada de la aguja fina y delicada de la jeringa Hamilton de 1.2 microlitros). Aprovechando que hemos quitado el septum, también vamos a realizar una limpieza del bloque de grafito donde se produce la vaporización de la muestra, para ello lo sacamos de su posición y lo limpiamos con aire seco, por último lo devolvemos a su posición original (ver Figura 5).
- Si se observan pequeñas partículas de goma se realizará el cambio de septum cuando se esté analizando estándar de agua (y no vapor de agua atmosférico) de ese modo habrá comunicación entre el tubo de entrada al sistema y el inyector (no estando bloqueada la comunicación por ninguna electroválvulas de la caja). En este caso, antes de finalizar el cambio de septum, y aprovechando que el sistema ha perdido el vacío, procedemos a limpiar también el tubo de muestra (bloque inyector a la cavidad del analizador). Para ello, desenroscamos el

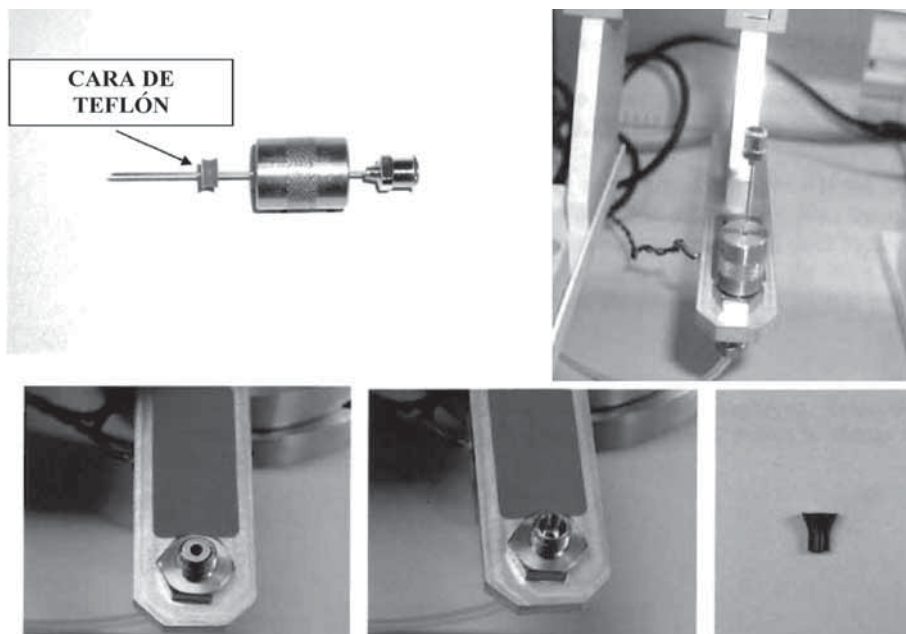


Figura 5. Bloque inyector. Esquema para el cambiado de septum.

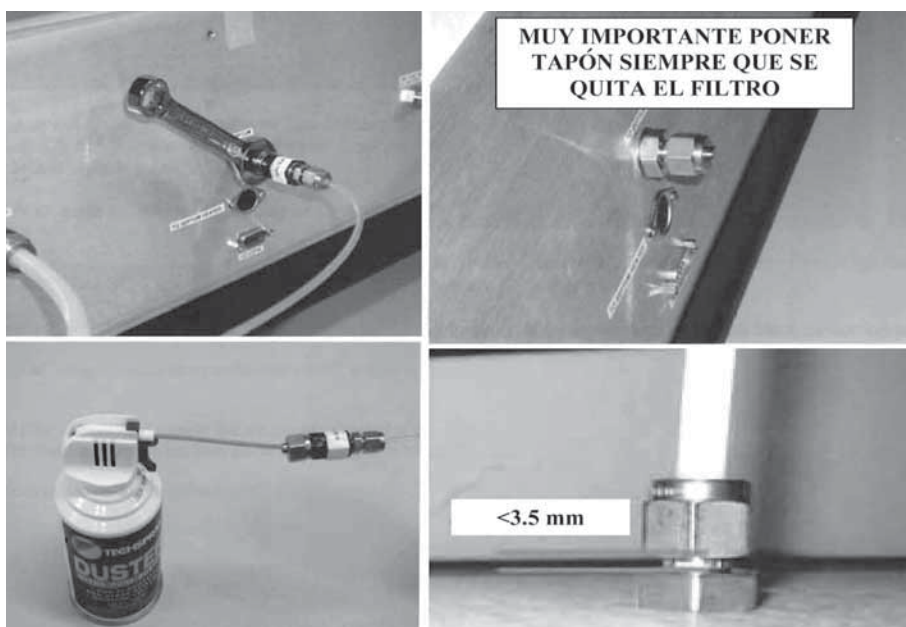


Figura 6. Esquema para limpieza del tubo de inyección mediante la botella de aire seco.

tubo de 1/8", tanto del bloque inyector como del analizador (incluyendo el filtro), inmediatamente, le colocamos el tapón al analizador, para evitar que entren partículas de polvo al sistema durante nuestra operación de limpieza. Limpiamos el tubo desde la posición del analizador (la cavidad o cámara de vacío), es decir, desde el filtro, con el bote de aire seco (Figura 6). Por último, montamos de nuevo el tubo (asegurándonos en todo momento que queda el sistema estanco) y marcamos en el analizador el botón, "septum cambiado". Entonces, el instrumento vuelve a coger vacío, operación que tarda unos cinco minutos aproximadamente. Pulsamos aceptar para volver al modo de configuración y, por último, pulsamos salir, para volver a la pantalla principal.

Una vez que hemos finalizado este proceso, solo nos queda limpiar la jeringa Hamilton de 1.2 microlitros, que es la que nos introduce las muestras de los patrones de aguas en el sistema. Para ello, limpiamos la aguja con agua destilada, moviendo y girando varias veces el barrilete de la jeringa, y notaremos como se va desentramando la misma con el agua destilada. Si esto no ocurriera, podemos proceder a la limpieza de la aguja con acetona, repitiendo la misma operación que con el agua destilada, y terminando con una buena limpieza de agua destilada para evitar la contaminación de la cámara de medida.

#### **B) Ajuste del desplazamiento del láser (una vez a la semana):**

Con el paso del tiempo, es probable que el láser se desplace (normalmente está a -666) y descompense de su frecuencia. Para comprobar el ajuste del láser, marcamos la ventana "spectrum," y observamos el espectro de absorción de la molécula (ver Figura 9). Si el gran pico central del espectro de absorción se encuentra centrado en el cuadro gris, no hay necesidad de ajustar el desplazamiento del láser. Solo hay que ajustar el láser, si el pico central se ha desviado más de 0.25 GHz, como se puede ver en la Figura 7.

Si el pico está desplazado como podemos ver en el ejemplo de la Figura 9, debemos de marcar la opción "setup", y cuando nos aparece la nueva pantalla, marcar la opción "láser offset".

Una vez que hemos marcado "láser Offset" automáticamente nos aparece una nueva pantalla (ver Figura 8), con ella podemos desplazar el cuadro de centrado de pico (de color gris) en unidades de 0.25 GHz, número de unidades que debemos de comprobar a priori al ver el espectro, ya que hasta que no pongamos una nueva secuencia de muestras, no vamos a poder ver de nuevo el ajuste del láser, que debería quedar como podemos observar en la Figura 8.



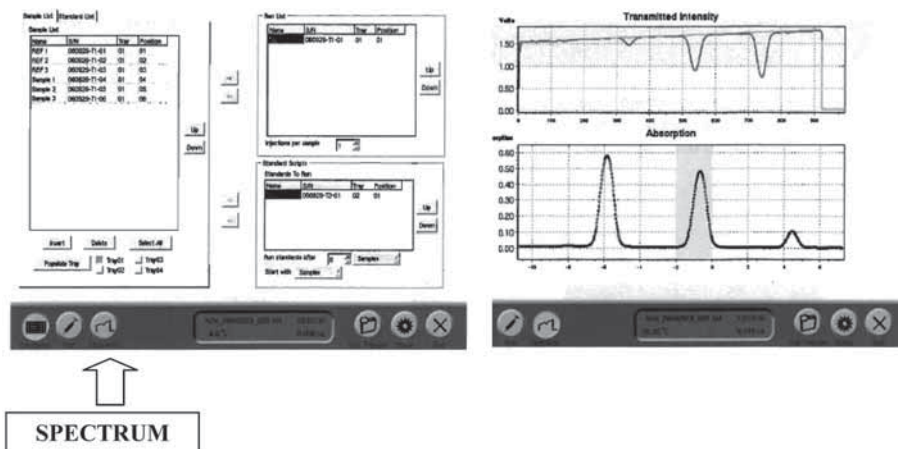


Figura 7. Pantalla de visualización del espectro de absorción.

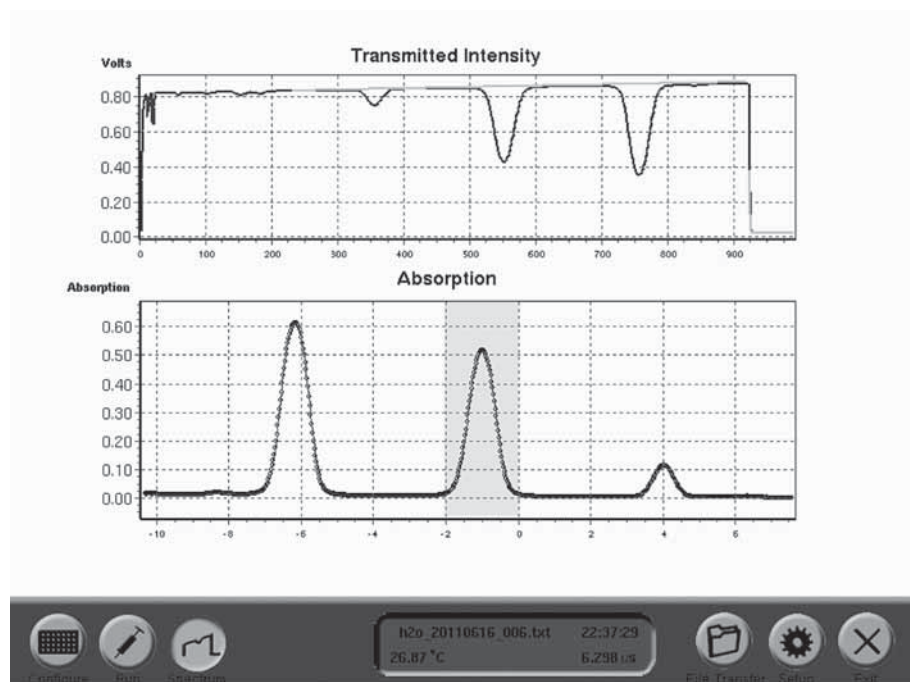


Figura 8. Pantallas de visualización para el ajuste del láser.

#	Sample Name	Sample S/N	Tray - Pos	H2O_N_cm3	Raw delta D	Raw delta 18O	Flag
01	LGR1	090827-T1-01	01-01	3.468e+16	-153.32	-19.79	norm
02	LGR1	090827-T1-01	01-01	3.424e+16	-154.17	-20.14	norm
03	LGR1	090827-T1-01	01-01	3.402e+16	-154.30	-20.02	norm
04	LGR1	090827-T1-01	01-01	3.303e+16	-155.00	-19.94	norm
05	LGR1	090827-T1-01	01-01	3.300e+16	-154.43	-19.80	norm
06	LGR1	090827-T1-01	01-01	3.292e+16	-155.77	-19.78	norm
07	LGR3	090827-T1-03	01-03	3.957e+16	-98.36	-12.86	norm
08	LGR3	090827-T1-03	01-03	3.915e+16	-85.85	-11.90	norm
09	LGR3	090827-T1-03	01-03	3.837e+16	-80.74	-11.40	norm
10	LGR3	090827-T1-03	01-03	3.950e+16	-81.93	-11.55	norm
11	LGR3	090827-T1-03	01-03	3.902e+16	-78.73	-11.14	norm
12	LGR3	090827-T1-03	01-03	3.809e+16	-81.81	-11.57	norm
13	LGR3	090827-T1-03	01-03	3.746e+16	-80.24	-11.42	norm
14	LGR3	090827-T1-03	01-03	4.010e+16	-80.77	-11.52	norm
15	LGR3	090827-T1-03	01-03	4.032e+16	-81.13	-11.54	norm
16	LGR3	090827-T1-03	01-03	4.153e+16	-78.14	-11.08	norm
17	LGR3	090827-T1-03	01-03	3.986e+16	-78.87	-11.15	norm
18	LGR3	090827-T1-03	01-03	4.097e+16	-79.62	-11.42	norm
19	LGR3	090827-T1-03	01-03	4.144e+16	-78.01	-11.12	norm
20	LGR3	090827-T1-03	01-03	-	-	-	-
21	LGR3	090827-T1-03	01-03	-	-	-	-

Testing Sample: 19 - LGR3 - 090827-T1-03      Tray 01 - Index 03      Flushing Cavity

h2o\_20110616\_006.txt    22:37:11  
26.87 °C    6.298 us

Configure   Run   Spectrum   File Transfer   Setup   Exit

Figura 9. Pantalla comienzo de la secuencia de medida.

## Cálculo de los resultados

El sistema muestra en pantalla (Figura 9) y almacena automáticamente los datos medidos en el disco duro. Posteriormente será necesario analizar los resultados y corregir los valores con los patrones. La composición isotópica del vapor de agua irá correlacionada con la hora UTC y, por tanto, con la derrota que lleve el barco en todo momento.

## Referencias

- CRAIG, H. 1961. «Isotopic variations in meteoric waters». *Science* 133: 1702-1703.
- CRAIG, H., L. I. GORDON. 1965. «Deuterium and Oxygen 18 variations in the ocean and the marine atmosphere», en E. TONGIORGI (ed.), *Stable Isotopes in Oceanographic Studies and Paleotemperatures*, pp. 9-130.
- HE, H, X. LEE, R. S. SMITH. 2001. «Deuterium in water vapor evaporated from a coastal salt marsh». *J. Geophys. Res.* 106: 12183-12191.
- KEELING, C. D. 1961. «The concentration and isotopic abundances of carbon dioxide and marine air». *Geochim. Cosmochim. Acta* 24: 277-298.



- MOREIRA, M. Z., L. S. L. STERNBERG, L. A. MARTINELLI, R. L. VICTORIA, E. M. BARBOSA, C. M. BORATES, A. C. NEPSTADS. 1997. «Contribution of transpiration to forest ambient vapour based on isotopic measurements». *Glob. Change Biol.* 3: 439-450.
- ROZANSKI, K., C. SONNTAG. 1982. «Vertical distribution of deuterium in atmospheric water vapour». *Tellus*, 34: 135-141.
- SCHOCH-FISHER, H., K. ROZANSKI, H. JACOB, C. SONNTAG, J. JOUZEL, G. OSTLUND, M. GEYH. 1984. «Hydrometeorological factors controlling the time variation of D,  $^{18}\text{O}$  and  $^3\text{H}$  in atmospheric water vapour in the Northern Westwind belt», *Isotope Hydrology*, pp. 3-30.
- YEPEZ, E. A., D. G. WILLIAMS, L. S. RUSSELL, L. GUANGHUI. 2003. «Partitioning overstory and understory evapotranspiration in a semiarid savanna from the isotopic composition of water vapour». *Agr. Forest Meteorol.* 119: 53-68.



## Medidas de tasas de disipación de energía cinética turbulenta

<sup>1</sup>Chouciño Vilela, P.; <sup>1</sup>Fernández Graña, R.; <sup>1</sup>Fernández Castro, B.; <sup>2</sup>Piedeleu, M.;  
<sup>2</sup>Rodríguez Santana, A.; <sup>1</sup>Mouriño Carballido, B.

<sup>1</sup>*Facultade de Ciencias del Mar, Universidade de Vigo*

<sup>2</sup>*Universidad de Las Palmas de Gran Canaria*

### Conceptos generales

La turbulencia representa la canalización de la energía cinética desde las grandes escalas espaciales en las que se genera (10-1000s km, meso y macroescala) hacia las pequeñas escalas en las que finalmente se disipa en forma de calor debido a la acción de la viscosidad (1-10s cm o microescala). La tasa a la cual tiene lugar la disipación de la energía cinética hacia las pequeñas escalas se denota como  $\epsilon$ . Considerando una serie de simplificaciones matemáticas se puede asumir que, bajo determinadas circunstancias, la tasa de generación y disipación de la energía cinética son equivalentes (Kolmogorov, 1941). Por lo tanto, la determinación de  $\epsilon$  permite caracterizar la energía cinética asociada al movimiento turbulento. La relación entre  $\epsilon$  y las fuerzas de flotabilidad determina el valor del coeficiente de difusión turbulenta vertical o difusividad ( $K_z$ ) (Osborn, 1980).

La difusividad juega un papel clave en la biosfera marina y en la regulación del clima mediante su implicación en el transporte y almacenaje de calor, gases disueltos y sales nutrientes (Rahmstorf, 2003). Su influencia en la distribución de sales nutrientes es fundamental en la fijación de carbono inorgánico mediada por el fitoplancton y la posterior exportación de carbono orgánico hacia las capas profundas del océano.

### Finalidad. Campo de aplicación

Existe un gran desconocimiento acerca de la magnitud y variabilidad de los procesos de mezcla en el océano. La información obtenida tras

cinco décadas de observaciones indica que los valores de  $K_z$  en la termoclina son un orden de magnitud más pequeños que las estimaciones realizadas a partir de modelos oceánicos. Esto podría indicar que la mayor parte de los procesos de mezcla ocurren en una zona diferente del océano o asociados a eventos de naturaleza episódica (Sriver y Huber, 2007). La escasez de observaciones, junto con la sensibilidad de los modelos climáticos al valor de  $K_z$ , ponen de manifiesto la necesidad urgente de obtener un mayor número de medidas directas de  $\epsilon$  (Wunsch y Ferrari, 2004). Esto se ve facilitado hoy en día por la aparición en el mercado de diferentes instrumentos que permiten obtener medidas de microturbulencia. Entre estos equipos se encuentran los perfiladores MST (Micro-Structure Turbulence profiler) (Prandke y Stips, 1998) y TurboMap (Wolk et ál., 2002). En este capítulo se describe la realización de medidas de tasas de disipación de energía cinética turbulenta mediante la utilización de un perfilador MST. Los objetivos concretos de esta actividad son:

1. Obtención de medidas directas de  $\epsilon$  a lo largo de grandes escalas espaciales en océano abierto.
2. Comparación entre las medidas directas de  $\epsilon$  y las estimas realizadas mediante cálculos empíricos.
3. Estudio de la variabilidad de  $K_z$  a lo largo de grandes escalas espaciales.
4. Cuantificación de la entrada de nutrientes hacia la capa fótica mediante procesos de difusión turbulenta.

## Equipamiento necesario

El sistema de medida incluye, además del perfilador, un torno con el que se realiza el lanzamiento del equipo al agua, un mando de control y una caja de alimentación eléctrica para el torno, la unidad de cubierta que recibe los datos del perfilador, y un ordenador con el que se realiza la adquisición y el procesamiento de los datos. El cable que sujeta el aparato es además el cable transmisor de datos y posee las mismas propiedades de hundimiento que el perfilador.

El perfilador MST permite medir la turbulencia de microescala hasta una profundidad máxima de 500 m. En su extremo inferior va equipado con sensores de microestructuras (sensor de cizalla airfoil PNS98 (Neumann y Prandke, 1992) y microtermistor FP07), y un sensor de aceleración para comprobar las inclinaciones del perfilador al atravesar la columna de agua. Dispone de otros sensores adicionales como un sensor de turbidez, dispersión de luz y fluorescencia. El modelo utilizado incorpora además un CTD (*Conductivity Temperature Depth*) de alta precisión, lo que permite el registro simultáneo de perfiles de cizalla y parámetros oceanográficos con una alta resolución vertical.

TABLA 1  
Descripción de los sensores incorporados en el perfilador MST  
(versión estándar).

## SENSORES DE MICROESTRUCTURAS

Parámetro	Principio	Elemento sensible	Longitud de la punta del sensor	Constante de tiempo <sup>1</sup>
Temperatura	Medida de resistencia	Microtermistor FP 07 (varilla de vidrio)	Aprox. 0.3 mm	Aprox. 10 ms
Temperatura (alternativo)	Medida de voltaje	Termopar NiCr-Ni en el interior de un tubo de acero de $\varnothing$ 0.25 mm	Aprox. 0.5 mm	Aprox. 6 ms

SENSORES DEL CTD<sup>2</sup>

Parámetro	Principio	Rango	Precisión	Resolución	Constante de tiempo
Presión	Piezoresistencia	Definido por el usuario	+/- 0.1% de la escala total	0.002% de la escala total	40 ms
Temperatura	Pt 100	-2...+38 °C	+/- 0.01 °C	0.001 °C	160 ms
Conductividad	Celda inductiva	0...60 mS/cm	+/- 0.01 mS/cm	0.001 mS/cm	100 ms

## SENSOR DE CONTROL

Parámetro	Principio	Elemento sensible	Constante de tiempo
Perfil de aceleración horizontal	Medida de la fuerza en una masa pendular	Placa de piezocerámico	Aprox. 3 ms

1. La constante de tiempo hace referencia al tiempo de reacción/respuesta del sensor a un salto brusco en el parámetro a medir. Por ejemplo, el tiempo de respuesta del sensor de temperatura es de 10 ms. Esto significa que cuando se produzca un salto importante en el valor de este parámetro transcurrirán 10 ms hasta que el sensor muestre el 63% de este cambio. Los tiempos de respuesta de los sensores del perfilador MST permiten mostrar estructuras en la estratificación T/S con una resolución vertical de hasta 0.1 m sin pérdida significativa de información (sensores CTD) y 0.02 m para los sensores de microestructura.

2. El perfilador MST también está equipado con sensores adicionales de fluorescencia y turbidez de la empresa Alec Ellectronics, Japón. Los sensores son calibrados internamente, con una salida máxima de fluorescencia de 200 ppb Uranina y una turbidez máxima de 200 ppm Caolín.

Los sensores de cizalla PNS están constituidos por una placa pequeña de piezocerámico (material que al deformarse genera un voltaje) unida mediante una placa metálica a una pieza de epoxi con forma aerodinámica (*airfoil*). La componente transversal del campo de velocidad ejerce una fuerza sobre el *airfoil* que se transmite hasta el piezocerámico, dando como resultado una señal de voltaje proporcional a dicha fuerza (Prandke y Stips, 1996). Las señales de voltaje son convertidas en variaciones de velocidad con una resolución temporal que permite medir a escala de cm las fluctuaciones de velocidad que genera la microturbulencia en el océano.

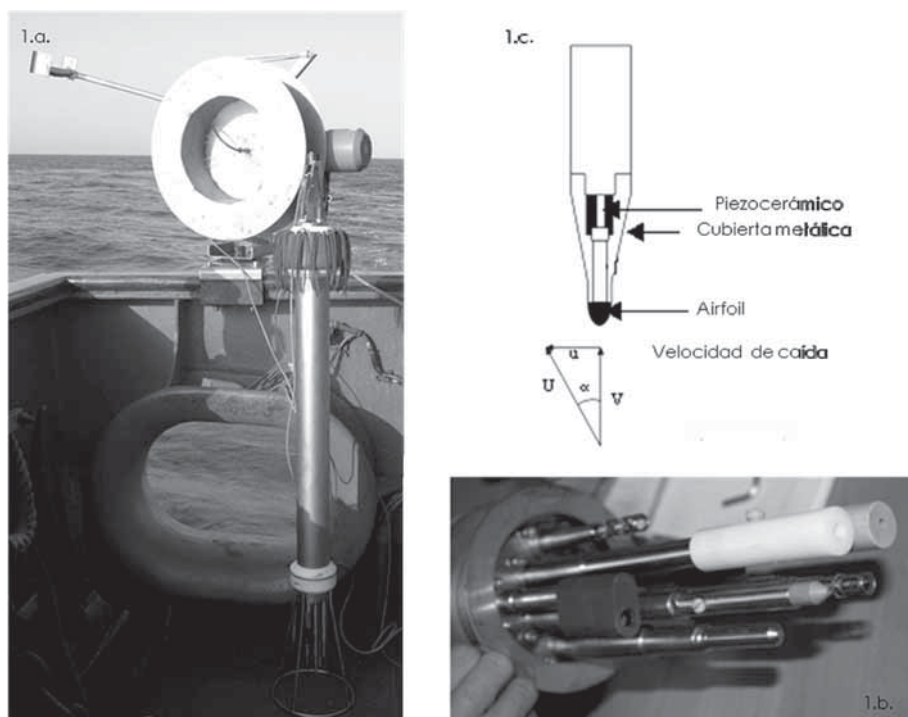


Figura 1. a. Rotor y perfilador MST en la popa del barco. b. Extremo inferior del perfilador donde se encuentran los diferentes sensores. c. Componentes del sensor de cizalla PNS98 y esquema de las medidas.

### Reactivos u otro material fungible

- CRC, previene fallos electrónicos causados por la penetración de agua o humedad.
- Grasa de silicona.
- Conectores submarinos.
- Repuestos de los sensores de cizalla.

## Descripción de la técnica

La maniobra de lanzamiento del perfilador se realiza desde la popa del barco, con el motor parado y con el barco abatiendo a favor de la dirección del viento. De esta manera se evitan posibles interferencias con la turbulencia generada por la hélice y el roce del cable con el casco. Durante esta operación son necesarias dos personas, una encargada del control del torno con el que se realiza el largado del cable, y la otra supervisando la recogida de datos en el ordenador.

El perfilador está diseñado para la toma de datos en caída libre. Se deben de evitar tensiones en el cable, para lo cual es necesario largarlo con suficiente holgura. La velocidad de caída debe de estar comprendida entre 0.4 y 0.7 m s<sup>-1</sup>. Esto se consigue mediante combinaciones de anillas de flotación y peso que se insertan en el perfilador. Cada anilla de flotación supone una disminución de la velocidad de 0.3 m s<sup>-1</sup> y cada anilla de peso un aumento de 0.1 m s<sup>-1</sup>. Es conveniente realizar una prueba para comprobar la velocidad de hundimiento del perfilador antes de la primera estación, y corregir la flotabilidad siempre que cambien las condiciones hidrográficas. Dado que la turbulencia es un proceso intermitente es necesario realizar varios perfiles en cada una de las estaciones, que posteriormente se promedian.

La adquisición y procesado de los datos se realiza con los *programas* comerciales SST-SDA (Standard Data Acquisition) y DATpro de Sea & Sun Technology ([www.sea-sun-tech.com](http://www.sea-sun-tech.com)). Ambos programas se ejecutan con Windows 98/2000/XP/7. El primero de ellos permite la adquisición de datos, obteniéndose un archivo de datos en bruto con extensión \*.MRD. Posteriormente con el programa *DATpro* los datos se visualizan y se convierten a formato ascii (extensión \*.TOB), se transforma la señal de voltaje a datos físicos y se realiza el control de calidad de los mismos mediante el filtrado de las perturbaciones de alta y baja frecuencia. Por último, este programa permite calcular  $\epsilon$  y Kz.

## Calibración

Todos los sensores instalados en el perfilador se calibran inicialmente en fábrica, desde donde se emite un documento final con los coeficientes de calibración de cada uno de ellos. En el caso que nos ocupa, la última calibración completa del sistema fue realizada por la compañía Sea and Sun Technology en abril de 2009.

Para introducir posibles cambios en las calibraciones individuales de cada sensor, el menú principal del programa de adquisición de datos SST-SDA ofrece la opción calibración (*Calibrate*). Esta opción permite visualizar y modificar los coeficientes de calibración de los sensores seleccio-

nando **Show Coefficients**. Esta selección abre una ventana de diálogo con un cuadro de listado de los diferentes sensores que incorpora el perfilador. Elegido el sensor de interés, el resto de los campos muestran los coeficientes de calibración de dicho sensor y permiten introducir las nuevas calibraciones (Figura 2). Cualquier cambio en los coeficientes de calibración debe hacerse con extrema precaución, ya que influye directamente en la conversión de los datos adquiridos (voltaje) a datos físicos.

En el caso de los sensores de cizalla PNS también es necesario ajustar la sensibilidad. Es importante contabilizar los lances que acumula cada sensor porque su sensibilidad disminuye con el tiempo y el uso. Las moléculas de agua penetran a través de los materiales que se utilizan normalmente para aislar el piezocerámico (goma de silicona, neopreno o poliuretano) reduciendo la impedancia de esta pieza, lo que se traduce en una pérdida de sensibilidad que afecta a las medidas. La sensibilidad se calcula y se corrige también en fábrica, y su valor se tiene en cuenta en el cálculo de las constantes del sensor de cizalla (ver ecuación 9 del apartado de cálculo de los resultados).

#### SEA & SUN TECHNOLOGY GmbH

##### Calibration coefficients for Probe MSS016

Date: 18.2.2004  
Baudrate: 614400

##### Counter Type: logical

Address: 0 Type: CNT Name: CNT  
A[0] = 3.27680E+04  
A[1] = 1.00000E+00 Range : 0.65535  
A[2] = 0.00000E+00

##### Temperature Model: Thermometrics FP07

Address: 1 Type: T1 Name: NTC1 Unit: °C  
A[0] = 1.39239E+01 Date of Calib.: 08.4.2009  
A[1] = 5.23183E-04 Range: -2.32  
A[2] = -1.45420E-09 Calib. Range: 0.31  
A[3] = 3.42757E-14  
A[4] = -2.30522E-19

##### Pressure Model: Keller PA7-50 Progress

Address: 2 Type: P Name: P Unit: dbar  
A[0] = 1.90713E+02 Date of Calib.: 08.4.2009  
A[1] = 6.60893E-03 Range: 0.400  
A[2] = 2.58461E-10 Calib. Range: 0.401  
A[3] = -1.13032E-14

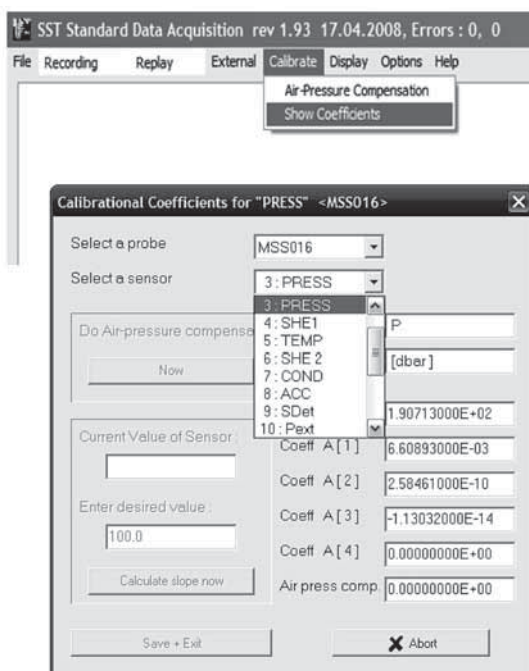


Figura 2. Coeficientes de calibración emitidos por la compañía para los sensores de presión y temperatura (izquierda) y cuadros de diálogo en el programa de adquisición de datos para introducir los coeficientes de calibración (derecha).



## Cuadro sinóptico de la técnica

### Instalación del equipo

1. Instalar el torno, que alberga el cable de largado y adquisición de datos, en la borda del barco, y próximo a este la caja metálica de alimentación eléctrica.
2. Comprobar las conexiones:
  - Conectar el cable de largado y adquisición de datos (cable naranja) al perfilador y a la unidad de cubierta.
  - Conectar a la caja de alimentación el motor del torno (cable gris) y el mando de control del torno.
  - Conectar la caja de alimentación a la corriente eléctrica (cable negro).
  - Conectar la unidad de cubierta al ordenador (puerto USB) y a la corriente eléctrica.
3. Encender el ordenador y la unidad de cubierta; comprobar que se reciben los datos en la pantalla del programa de adquisición.
4. Quitar los tapones protectores de los sensores de cizalla.

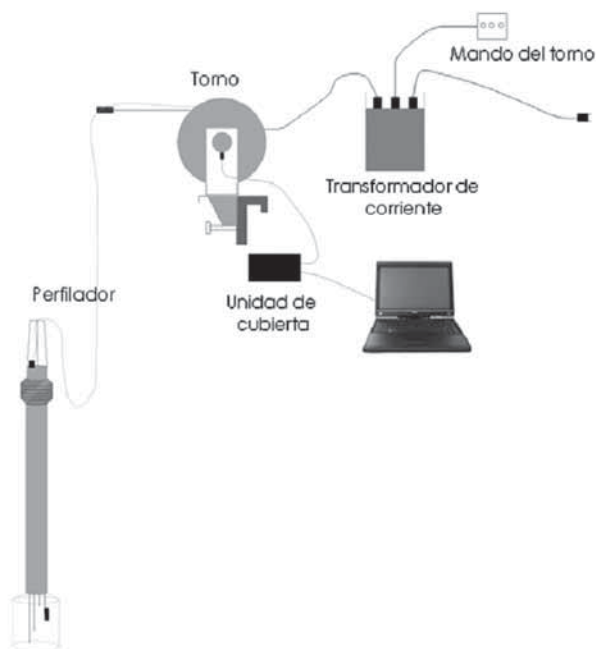


Figura 3. Esquema de los componentes que integran el sistema de medida.

5. Introducir manualmente el perfilador en el agua y largar el equipo sin pasar el cable por el brazo del torno.
6. Comenzar a grabar los datos al iniciar el largado del equipo.
7. Parar la grabación al alcanzar la profundidad deseada o cuando queden 10 vueltas de cable en el torno (vueltas de seguridad).
8. Recuperar el perfilador pasando el cable por el brazo del torno y cobrarlo a una velocidad que permita su correcto enrollado en el torno.
9. Con el perfilador de nuevo en superficie repetir la operación un mínimo de 3 veces. Tras el último perfil subir a bordo el perfilador manualmente.
10. Endulzar todo el equipo y lavar con agua destilada todos los sensores.
11. Colocar las protecciones a los sensores de cizalla.

### Adquisición de datos (*Software SST-SDA*)

La opción **Recording** del menú principal del programa de adquisición permite grabar los datos recibidos desde el perfilador. Por defecto aparece activado el modo de grabación en continuo (*Continuous*), que almacena todo el conjunto de datos. En principio es el modo de grabación que interesa; *Time Driven* almacena los datos solo a intervalos de tiempo definidos y *Value driven* cuando un sensor determinado registra un valor que no entra en un intervalo definido previamente (Figura 4). Pulsando sobre **Start Recording** comienza la grabación de datos en un archivo temporal. Durante la grabación, la línea de estado muestra distintos paneles informativos:

- Panel 1. Indica que se están grabando datos (*Recording*).
- Panel 2. Indica el archivo de configuración del sistema por defecto (*Config=MSS016.SPJ*).
- Panel 3. Muestra el nombre del último archivo de datos en bruto guardado.
- Panel 4. Muestra el número de bytes que se van almacenando en el archivo temporal.

Para saber el momento en el que el perfilador alcanza la profundidad deseada hay que fijarse en la entrada de datos en pantalla en la columna de presión (press [dbar]). En ese instante pulsar sobre **Stop Recording** para finalizar la grabación (Figura 4). Aparece entonces un cuadro de diálogo que permite editar el cabecero e introducir información sobre las características de la estación oceanográfica en cuestión (buque, campaña, operador, posición geográfica y otros comentarios) (Figura 5).

Al cerrar la ventana de edición del cabecero se presenta la opción de guardarlo como plantilla, para utilizarlo en otros perfiles, o bien guardarlo solo como cabecero para el archivo actual de datos. Tras optar por una de estas dos opciones un último cuadro de diálogo permite nombrar el archivo de datos y elegir el directorio donde se quiere guardar.

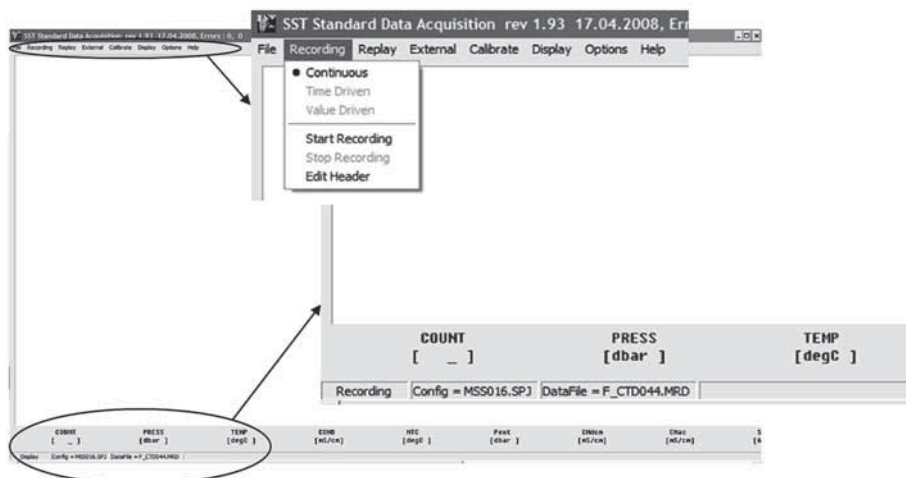


Figura 4. Pantalla y menú principal del programa de adquisición de datos SST-SDA.

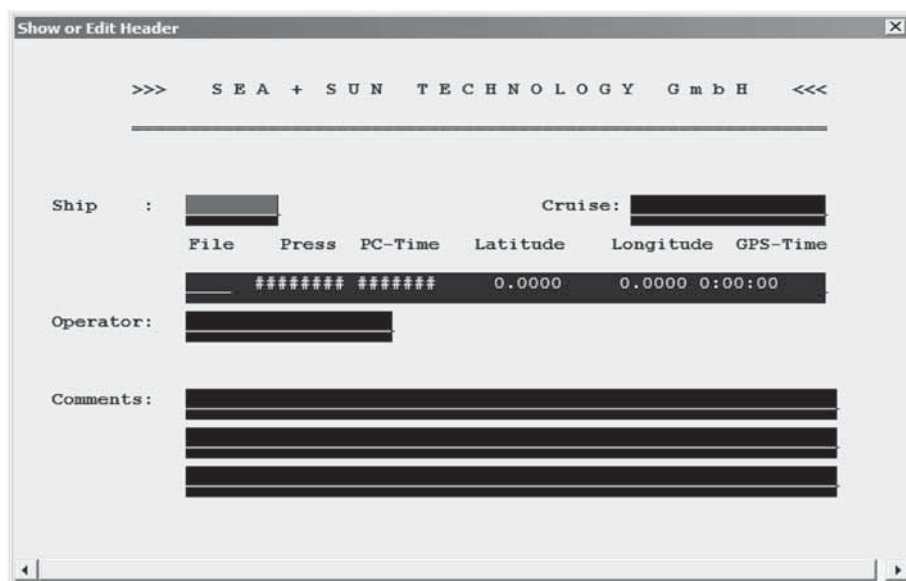


Figura 5. Ventana de edición del cabecero.

### Procesado de datos (*Software DATpro*)




El primer paso es confirmar la correcta adquisición de datos. Dado que los datos válidos son aquellos registrados en caída libre del perfilador, habrá que analizar y en ocasiones eliminar los registros al alcanzar el límite

de longitud del cable, o bien al dejar de largar una vez alcanzada la profundidad deseada.

La utilidad **Cutgraf** permite cortar el registro de datos al inicio y/o al final del perfil del archivo de datos en bruto (\*.MRD) y convertir este archivo a formato ascii (\*.TOB). En su pantalla gráfica se pueden representar un máximo de seis sensores frente a un eje vertical que muestra el conjunto de registros y, de este modo, localizar el posible punto de corte (Figura 6).

#### ESQUEMA 1

Modo de operación de la herramienta *cutgraf* (acompañado de Figura 6).

	<p>El primer paso es seleccionar los archivos de entrada *.MRD que se quieren cortar (todos los archivos de los perfiles/lances realizados en una estación). Para ello se utilizan la opción del menú "<b>data→select input files for file list/add input files to file list</b>", o los iconos correspondientes.</p>
	<p>La lista de los archivos seleccionados se muestra en el cuadro de la esquina superior derecha de la ventana principal. Para realizar la representación gráfica se hace doble <i>click</i> en un archivo de esa lista. Los sensores registrados en el archivo seleccionado se muestran en la ventana debajo de la lista de archivos.</p>
	<p>La representación gráfica se configura a través del cuadro de diálogo de opciones ("<b>open option dialogbox</b>"). Las entradas de este cuadro de diálogo son autoexplicativas. Permite seleccionar los sensores que se quieren representar, hasta un máximo de seis.</p> <p>Se seleccionan los siguientes sensores:</p> <p><b>Presión.</b> En el perfil de presión se puede observar si el perfilador ha bajado a una velocidad constante. Cualquiera salto en la línea de presión indica la existencia de tirones en el cable durante su descenso, debiendo eliminar el registro de datos a partir de ese punto.</p> <p><b>Temperatura.</b> Su perfil ofrece una primera visión de la estructura de la columna de agua y la posición de la termoclina.</p> <p><b>Cizalla (shear).</b> Se debe comprobar que los dos sensores de cizalla instalados en el perfilador están registrando una señal parecida.</p>
	<p>La función <i>zoom</i> de la pantalla gráfica se activa pulsando el botón izquierdo del ratón y manteniéndolo mientras se arrastra el cursor por el área que se desea ampliar. El área seleccionada, indicada por la zona marcada en rojo, será ampliada. Para desactivar esta función se pulsa el botón derecho del ratón mientras el cursor se encuentra dentro de la gráfica.</p>
	<p>La barra azul de la pantalla gráfica se arrastra con el cursor y se sitúa a la altura del registro a partir del cual se quiere cortar el perfil. La zona a eliminar aparece marcada en gris.</p>
	<p>El archivo de entrada se sustituye. Para ello la opción "<b>cut data lines and save output file</b>" permite guardar el nuevo perfil y convertirlo a extensión *.TOB. Este nuevo archivo se guarda por defecto en la carpeta <i>utilities</i> del programa <i>DATpro</i>.</p>

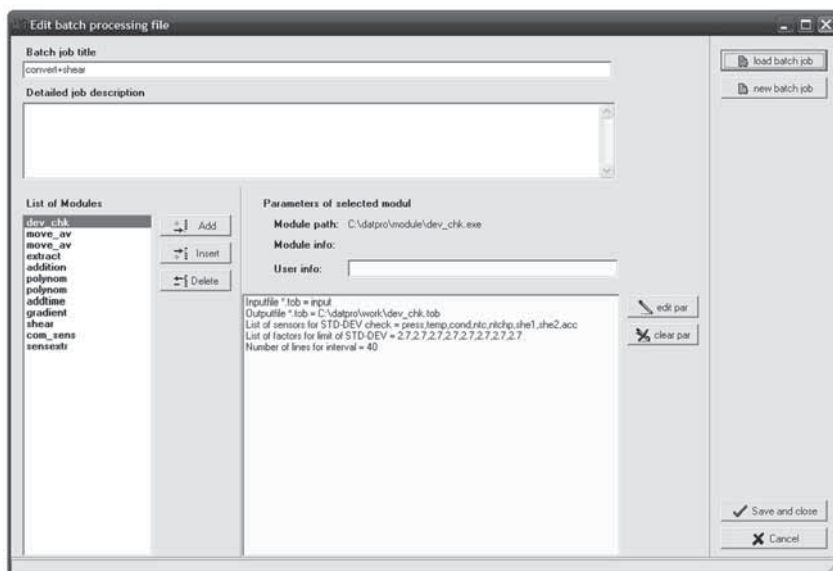
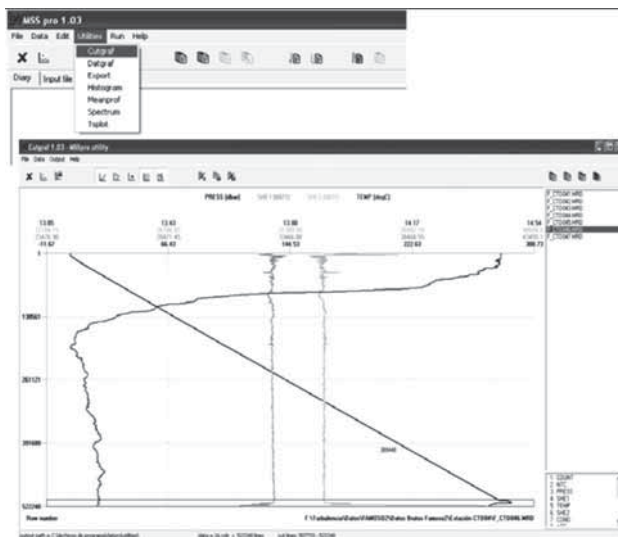
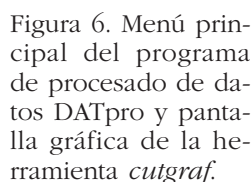



Figura 7. Cuadro de diálogo de configuración de un *batch*.

### Diseño de procesos “batch” o procesamientos por lotes

El programa *DATpro* permite diseñar diferentes *batches* mediante la combinación de módulos de cálculo individuales, que se ejecutan sucesivamente para calcular un parámetro final, en este caso,  $\varepsilon$  y Kz.

ESQUEMA 2

Modo de **diseño** de un *batch* (acompañado de Figura 7).

	Abrir el cuadro de diálogo de configuración ( <i>“edit batch processing file”</i> ) con el icono correspondiente de la barra del menú principal o mediante el menú <i>“edit→batch job”</i> .
Si se desea modificar un <i>batch</i> ya existente seleccionar la opción <i>“load batch job”</i> , en la esquina superior derecha del cuadro de diálogo abierto. Se muestra la configuración actual del <i>batch</i> : título ( <i>“batch job title”</i> ), breve descripción ( <i>“detailed job description”</i> ), lista de módulos que lo integran ( <i>“list of modules”</i> ), y cuadro con los parámetros del módulo seleccionado ( <i>“parameters of select modul”</i> ).	
Las opciones <i>“add, insert, delete”</i> permiten modificar la lista de módulos.	
Para modificar los parámetro de un módulo, seleccionar el módulo en particular de la lista con un <i>clíc</i> con el botón izquierdo del ratón. Se abre el cuadro de diálogo de configuración de parámetros en la parte inferior izquierda. Para cambiar el valor o tipo de parámetro, hacer doble <i>clíc</i> con el botón izquierdo sobre cada entrada.	
Para guardar la configuración del <i>batch</i> utilizar la opción <i>“save and close”</i> . Se genera así un archivo con extensión *. MSB que se guarda por defecto en la carpeta <i>batch</i> del programa <i>DATpro</i> .	
Importante: hay que tener especial cuidado con los nombres de los archivos de entrada y salida de cada módulo. Los módulos se ejecutan sucesivamente, y el nombre del archivo de salida de un módulo ( <i>“outputfile *.tob”</i> ) tiene que ser igual al nombre del archivo de entrada del módulo siguiente ( <i>“inputfile *.tob”</i> )	

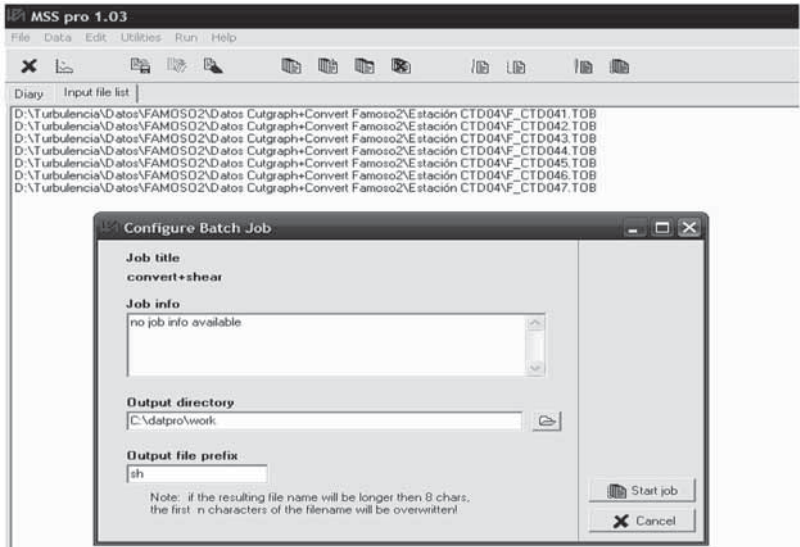





Figura 8. Listado de archivos de entrada y cuadro de configuración de los archivos de salida.

Aplicación de un “batch”

Una vez diseñados, los *batches* se aplican a los archivos de interés.

ESQUEMA 3

Modo de aplicación de un *batch* (acompañado de Figura 8).

 	El primer paso es seleccionar los archivos *. TOB, obtenidos con la utilidad <i>cutgraf</i> , sobre los que se quiere ejecutar el <i>batch</i> . Para ello se crea una lista de archivos de entrada mediante el menú “ <i>data→select input files for file list/add input files to file list</i> ” o los iconos correspondientes.
La lista de archivos se muestra en la pestaña “ <i>input file list</i> ” de la ventana principal.	
	Para seleccionar el <i>batch</i> que se quiere ejecutar ir al menú “ <i>run→batch job</i> ” o pulsar sobre el icono correspondiente de la barra de opciones.
Si Una vez seleccionado aparece el cuadro de diálogo “ <i>configure batch job</i> ” con la siguiente información: título (“ <i>job title</i> ”), apartado de información (“ <i>job info</i> ”), directorio de salida (“ <i>output directory</i> ”), y prefijo del nombre del archivo de salida (“ <i>output file prefix</i> ”).	
Las En este caso, tanto el directorio de salida como el prefijo identificador del archivo de salida deben ser especificados.	
Aplicar el <i>batch</i> e iniciar el procesado de datos de los archivos seleccionados pulsando sobre la opción “ <i>star job</i> ”.	
Importante: El nombre del archivo de salida incluirá el prefijo especificado y el nombre del archivo de entrada. Si el nombre resultante supera los 8 caracteres, los <i>n</i> primeros caracteres del archivo de entrada se sobrescriben con el prefijo de salida seleccionado.	

Cálculo de los resultados

La transformación de la señal de voltaje a datos físicos (cizalla) se basa en el procedimiento descrito por Prandke y Stips (1996), basado en la teoría de Allen & Perkins (1952). Para un sensor de cizalla en un flujo no viscoso, de velocidad *U* y ángulo de ataque *a* (Figura 1.c.), la fuerza transversal por unidad de longitud debida al flujo potencial (*fp*) se puede expresar como:

$$fp = \frac{1}{2} \rho U^2 \frac{dA}{dx} sen(2\alpha) \tag{1}$$

donde *p* es la densidad del fluido y *dA/dx* es la señal de voltaje en la dirección axial. Para obtener la fuerza transversal total (*F*) se integra la ecuación (1) a lo largo del eje *x*:

$$F = \frac{1}{2} \rho U^2 A \sin(2\alpha) \quad (2)$$

Debido a la relación lineal existente entre la respuesta en voltaje ( $E$ ) y  $F$ , la ecuación (2) se puede escribir como:

$$E = \rho U^2 S \sin(2\alpha) \quad (3)$$

donde  $S$  es la sensibilidad del sensor, que se determina en el proceso de calibración del sensor de cizalla en fábrica.

Considerando la ganancia eléctrica total del sensor ( $G$ ) (relación entre la amplitud de la señal de salida y entrada) y utilizando la relación angular  $\sin(2\alpha) = 2 \sin\alpha \cos\alpha$ , la ecuación anterior se puede escribir como:

$$E = 2\sqrt{2} \rho G S_{rms} V u \quad (4)$$

donde  $V$  es la componente axial y  $u$  es la componente transversal del campo de velocidad (Figura 1.c.).

Para obtener la velocidad de cizalla se calcula la derivada temporal. En un medio que evoluciona lentamente con respecto a la toma de datos se puede asumir la hipótesis de Taylor. Para medidas de microturbulencia con un perfilador que se mueva a una velocidad mayor de  $0.3 \text{ m s}^{-1}$  se satisface esta condición (Prandke & Stips, 1996) y las derivadas temporales se pueden transformar en derivadas espaciales en la dirección del flujo principal.

$$\frac{du}{dz} = (2\sqrt{2} \rho G S_{rms} V^2)^{-1} \frac{dE}{dt} \quad (5)$$

Partiendo de la ecuación (5) calculamos el dato bruto de cizalla ( $sh_{raw}$ ) definido como:

$$\frac{du}{dz} = \frac{1}{\rho V^2} \times \frac{dsh_{raw}}{dt} \quad (6)$$

Sustituyendo en la ecuación (5):

$$sh_{raw} = \frac{1}{(2\sqrt{2}SG)} \times E \quad (7)$$

Considerando la relación entre la salida del convertidor analógico-digital de la sonda ( $R$ ) y  $E$ :

$$E = b_0 + b_1 R \quad (8)$$



La ecuación (7) se puede escribir como:

$$sh_{raw} = \frac{1}{(2\sqrt{2}SG)} \times (b_0 + b_1 R) = \frac{b_0}{2\sqrt{2}SG} + \frac{b_1}{2\sqrt{2}SG} \times R = a_0 + a_1 R \quad (9)$$

donde los valores de las constantes del sensor de cizalla para la sonda MST son  $b_0 = 4,577707e^{-5}$ ,  $b_1 = 9,155423e^{-5}$  y  $G = 11$ . Por lo tanto  $a_0 = S^{-1} \times 1.47133e^{-6}$  y  $a_1 = S^{-1} \times 2.94226e^{-6}$ .

TABLA 2

Descripción de los módulos del *batch* con el que se inicia el procesamiento de datos y se calcula la velocidad de cizalla.

TÍTULO DEL <i>BATCH</i>	SHEAR_ACRÓNIMO DE LA CAMPAÑA
FINALIDAD	TRANSFORMACIÓN DE LA SEÑAL DE VOLTAJE A DATOS FÍSICOS (VELOCIDAD DE CIZALLA)
PREFIJO DE SALIDA	sh
ARCHIVOS DE ENTRADA	PARTE DEL ACRÓNIMO, Nº DE ESTACIÓN, Nº DE PERFIL
ARCHIVO DE SALIDA	sh, PARTE DEL ACRÓNIMO, Nº DE ESTACIÓN, Nº DE PERFIL
MÓDULOS	DESCRIPCIÓN
Dev_chk	Comprobación de la desviación estándar y eliminación de <i>outliers</i> . Calcula la desviación estándar por intervalos y elimina los valores que superan un rango definido como $\pm \delta$ veces la desviación estándar calculada. Por defecto el intervalo es de 40 registros y $\delta$ es igual a 2.7. Se aplica a los sensores de presión, temperatura, conductividad, cizalla, y aceleración.
Move_av	Elimina ruido de alta frecuencia. Suaviza los valores del sensor o sensores seleccionados utilizando una media móvil con un ancho de ventana definido. El tamaño de ventana (N) para el cálculo de la media debe ser menor que el número total de registros, y un valor impar. Se aplica al sensor de presión.
Extract	Extrae el rango de profundidad útil. Por defecto 10-400. El valor del límite inferior se recomienda que sea el doble del calado del barco. El límite superior variará en función del largado de cable en la maniobra de lanzamiento, que a su vez depende del tiempo disponible para cada lance y de las condiciones meteorológicas. Se aplica al sensor de presión.
Addition	Añade una constante a uno o más sensores seleccionados (en este caso los dos sensores de cizalla) para que puedan ser representados.

Polynom	Calcula un polinomio de orden $n$ para el sensor seleccionado (en este caso los sensores de cizalla), creando dos canales que se nombra como $sh_{raw1}$ y $sh_{raw2}$ . Es necesario especificar las constantes ( $a_0$ y $a_1$ ) de cada sensor de cizalla para realizar este cálculo polinómico. Dichas constantes se calculan a partir de la sensibilidad del sensor, que es específica para cada uno de ellos.
Addtime	Añade un nuevo canal temporal ( <i>time</i> ) que contiene marcas de tiempo en un formato específico. Estas marcas comienzan en el primer registro, añadiendo sucesivamente el intervalo de muestreo (0'9765 ms).
Gradient	Calcula el gradiente de los canales seleccionados ( $sh_{raw1}$ y $sh_{raw2}$ ) frente a un sensor específico ( <i>time</i> ) cuyos valores deben ser equidistantes. Genera dos nuevos canales que se denominan $dudt_1$ y $dudt_2$ .
Shear	Calcula la velocidad de cizalla horizontal, $du/dz$ , en términos de $s^{-1}$ , a partir de la ecuación (6), $\frac{du}{dz} = \frac{1}{\rho V^2} \times \frac{dsh_{raw}}{dt} \quad (6)$ donde $\rho$ es la densidad media y $V$ es la velocidad de caída del sensor, calculada a partir del sensor presión (dbar) y del canal temporal (ms). Se añaden así tres nuevos canales al archivo de entrada: $shear_1$ , $shear_2$ y $vel$ .
Com_sens	Realiza operaciones matemáticas (+, -, x y /) registro por registro. Calcula la pseudo-cizalla (pseudo-shear) dividiendo el sensor de aceleración (acc) por el canal de velocidad de caída (vel). El nuevo canal se denomina pshear y da una idea de las inclinaciones del perfilador a lo largo de la columna de agua.
Sensextr	Extrae los canales y sensores especificados. El archivo de salida con extensión *.TOB contiene dichos canales y sensores.

A partir de las medidas de fluctuación de la velocidad de cizalla a pequeña escala se estima la tasa de disipación de energía cinética turbulenta, definida como:

$$\varepsilon = \nu \frac{\partial u_i}{\partial x_j} \left( \frac{\partial u_i}{\partial x_j} + \frac{\partial u_j}{\partial x_i} \right) \quad (10)$$

donde  $\nu$  es la viscosidad cinemática del agua y  $u$  es la componente transversal del campo de velocidad. La barra superior representa la media sobre 12 términos de fluctuaciones turbulentas en el campo de velocidad, siendo prácticamente imposible medirlos simultáneamente. Sin embargo, para una

turbulencia isotrópica, la ecuación se simplifica, quedando únicamente un término independiente. En este caso se utiliza la siguiente fórmula isotrópica (Batchelor, 1953):

$$\varepsilon = 7.5\nu\left(\frac{\partial u}{\partial z}\right)^2 \quad (11)$$

donde  $\partial u/\partial z$  es el perfil vertical de cizalla obtenido con los sensores de la sonda.

La ecuación isotrópica implica considerar todo el rango de longitudes de onda relevantes para el perfil de cizalla, lo que significa que las medidas del perfilador deben resolver el espectro completo de fluctuaciones de la velocidad turbulenta. El espectro universal de energía cinética se divide conceptualmente en tres regiones. El subrango de energía abarca las grandes escalas de movimiento en las cuales tiene lugar principalmente la generación de la energía cinética, mientras que el subrango de disipación incluye las escalas más pequeñas en las cuales tiene lugar los procesos de disipación de energía debido a la viscosidad. Si el rango de escalas es suficientemente grande, existe un subrango intermedio (inercial) en el cual la forma del espectro es independiente de los procesos de generación y disipación de la energía. Asumiendo una serie de simplificaciones matemáticas en el subrango inercial la descripción del movimiento turbulento puede realizarse a partir de la descripción de  $\varepsilon$ . El límite superior del subrango de disipación está definido por la longitud de onda de Kolmogorov ( $k_k$ ) (Kolmogorov, 1941) y depende del nivel de turbulencia:

$$k_k = \frac{1}{2\pi} \times \left(\frac{\varepsilon}{\nu^3}\right)^{\frac{1}{4}} \quad (12)$$

Mientras que el límite superior está claramente definido, el límite inferior es más complicado de definir. Normalmente se utiliza el valor de 2 cpm que es el número de onda más bajo que pueden resolver los perfiladores de 1 m de longitud como el MST (Prandke y Stips, 1996).

TABLA 3

Descripción de los módulos del *batch* intermedio con el que se calcula la tasa de disipación de la energía cinética turbulenta ( $\epsilon$ ).

TÍTULO DEL <i>BATCH</i>	EPSILON_ACRÓNIMO DE LA CAMPAÑA
FINALIDAD	CÁLCULO DE LA TASA DE DISIPACIÓN DE LA ENERGÍA CINÉTICA TURBULENTA ( $\epsilon$ )
PREFIJO DE SALIDA	ep
ARCHIVOS DE ENTRADA	PARTE DEL ACRÓNIMO, Nº DE ESTACIÓN, Nº DE PERFIL
ARCHIVO DE SAL.	ep, PARTE DEL ACRÓNIMO, Nº DE ESTACIÓN, Nº DE PERFIL
MÓDULOS	DESCRIPCIÓN
Extract	Extrae el rango de profundidad útil.
Detrendn	Resta la tendencia lineal de los canales seleccionados ( <i>shear</i> <sub>1</sub> , <i>shear</i> <sub>2</sub> y <i>pshear</i> ), calculada a partir de un determinado intervalo de registros. Se trata de un filtro paso alto ( <i>High Pass Filter</i> , <i>HPF</i> ), que atenúa las componentes de baja frecuencia pero no las de alta frecuencia.
Response	Corrige el tiempo de respuesta del sensor seleccionado (temperatura, <i>temp</i> ) con un tiempo constante, incluyendo un filtro de paso bajo ( <i>LPF</i> , <i>Low Pass Filter</i> ) caracterizado por permitir el paso de las frecuencias más bajas y atenuar las frecuencias más altas.
Dis_spec	<p>Calcula la tasa de disipación de la energía cinética turbulenta (<math>\epsilon</math>) en <math>\text{Wkg}^{-1}</math> y el correspondiente número de onda de Kolmogoroff en cpm, ecuación (12), utilizando la ecuación isotrópica, ecuación (11):</p> $k_k = 1/(2\pi) \times (\epsilon/n)^{3/4} \tag{12}$ $\epsilon = 7.5\nu \left( \frac{\partial u}{\partial z} \right)^2 \tag{11}$ <p>donde <math>du/dz</math> es la velocidad de cizalla (calculada con el módulo <i>Shear</i> en el <i>batch</i> anterior) y <math>n</math> es la viscosidad cinemática del agua de mar (calculada a partir de la temperatura). Crea tres nuevos canales que se nombran como <i>eps1</i> (<math>\sim</math><i>shear</i><sub>1</sub>), <i>eps2</i> (<math>\sim</math><i>shear</i><sub>2</sub>), <i>peps</i> (<math>\sim</math><i>pshear</i>).</p>
Smooth	Calcula la media de dos canales o sensores que miden el mismo parámetro ( <i>eps1</i> y <i>eps2</i> ) tras comprobar los posibles picos. Para considerar un pico, el valor de uno de ellos debe diferir del valor del otro un factor especificado, tomando en ese caso el valor mínimo y rechazando el mayor. El objetivo es eliminar valores erróneos causados por el impacto de partículas en el perfil de la tasa de disipación. Añade un nuevo canal, <i>eps</i> .

Addition	Añade una constante a los canales seleccionados (eps y peps) para que puedan ser representados.
Log_10	Calcula el logaritmo en base 10 de uno o más canales. En este caso se aplica sobre el canal eps.
Polynom1	Calcula un polinomio de orden n para el canal seleccionado (eps), creando un canal adicional que se nombra como epsi. Este polinomio corrige en el nuevo canal la resolución espacial incompleta debido al tamaño del propio sensor. En este módulo se introducen los coeficientes correspondientes al equipo que se está utilizando (Prandke, 2007).
Polynom2	Calcula un polinomio de orden n para el canal seleccionado (epsi), creando un canal adicional que se nombra como epsilo. En este módulo se introducen los coeficientes correspondientes al número de onda de corte superior. Para un perfilador con una velocidad de caída no superior a $0.7 \text{ m s}^{-1}$ se recomienda un valor de 30 cpm para este límite. (Prandke, 2008).
Polynom3	Calcula un polinomio de orden n para el canal seleccionado (epsilo), creando un canal adicional que se nombra como epsilon. En este módulo se introducen los coeficientes correspondientes al número de onda de corte inferior, en este caso, 2 cpm (Prandke, 2008).
Exp_10	Calcula la inversa del logaritmo en base 10 de uno o más canales. En este caso se aplica sobre los canales eps y epsilon.
Press_av	Calcula valores promedio de los canales en un rango de presión definido. De este modo se normaliza la profundidad de los perfiles a intervalos de 1 m.
Log_10	Calcula el logaritmo en base 10 de uno o más canales. En este caso se aplica sobre el canal epsilon, peps, eps1, eps2 y eps.
Delsens	Elimina los canales seleccionados del archivo de entrada al módulo. Elimina en este caso epsi, epsilo, shear1, shear2, pshear, Kc1, Kc2, kcp, time y ncp.
Salinity	Calcula la salinidad como función de la temperatura, la conductividad y la presión. Los datos calculados se añaden al archivo en un nuevo canal que se nombra como sal.
Sigma_t	Calcula la densidad en función de la salinidad y la temperatura a presión cero. Los datos calculados se añaden al archivo en un nuevo canal que se nombra como sig_t.
Thorpe	Calcula la escala Thorpe, LT, para el canal sig_t, reordenando el perfil según un algoritmo de burbuja (Bubble-Sort). Es necesario establecer la dirección de ordenación según el canal seleccionado (sigma_t: ascendente).

BVFD	Calcula la frecuencia de Brünt Väisälä en s <sup>-2</sup> , utilizando los canales de presión y sigma_t, aplicando la siguiente fórmula: $N^2 = -\frac{g}{\rho(z)} \frac{d\rho}{dz}$ donde g=9.80665ms <sup>-2</sup> . Los datos calculados se añaden al archivo en un nuevo canal que se nombra como N^2.
Delsens	Elimina los canales seleccionados del archivo de entrada al módulo. Elimina en este caso el canal thorpe del archivo de salida.

Finalmente, el coeficiente de difusión turbulenta (kz) se calcula según la ecuación:

$$Kz = a \frac{\varepsilon}{N^2} \tag{13}$$

donde *a* es una constante (normalmente 0.2) y *N* es la frecuencia de Brünt Väisälä.

TABLA 4

Descripción de los módulos del *batch* final con el que se calculan los coeficientes de difusión turbulenta (Kz).

TÍTULO DEL <i>BATCH</i>	EDDY_ACRÓNIMO DE LA CAMPAÑA
FINALIDAD	CÁLCULO DE LOS COEFICIENTES DE DIFUSIÓN TURBULENTO (K <sub>z</sub> )
PREFIJO DE SALIDA	ed
ARCHIVOS DE ENTRADA	PORTE DEL ACRÓNIMO, Nº DE ESTACIÓN, Nº DE PERFIL
ARCHIVO DE SALIDA	ep, PARTE DEL ACRÓNIMO, Nº DE ESTACIÓN, Nº DE PERFIL
MÓDULOS	DESCRIPCIÓN
Exp_10	Calcula la inversa del logaritmo en base 10 de uno o más canales. En este caso se aplica sobre el canal <i>epsilon</i> .
Com_sens	Realiza operaciones matemáticas (+, -, x y /) línea por línea. Calcula el cociente (ε/N <sup>2</sup> ) dividiendo el canal <i>epsilon</i> entre el canal N^2. El nuevo canal se denomina K_diss.
Mult	Multiplica uno o más canales seleccionados por un valor constante. Multiplica el canal K_diss por la constante 0.2 para obtener el canal con los coeficientes de difusión turbulenta.
Log_10	Calcula el logaritmo en base 10 de uno o más canales. En este caso se aplica sobre <i>epsilon</i> y K_diss.

Los coeficientes de difusión se combinarán con los datos de concentraciones de nutrientes con el fin de cuantificar la entrada de nutrientes hacia la capa fótica mediante procesos de difusión turbulenta. En un siguiente paso se realizarán estimaciones empíricas de  $K_z$  mediante dos procedimientos diferentes: 1) a partir de los datos de velocidades horizontales medidas por la sonda ADCP, 2) a partir de coeficientes de arrastre del viento. De esta forma podremos comparar las medidas directas obtenidas con el perfilador MST con las estimaciones empíricas.

Debido al diferente comportamiento físico de los distintos perfiladores y sensores de cizalla existentes en el mercado, así como a las diferentes condiciones de medida, no existe un esquema estandarizado para el procesamiento de los datos. El procesamiento definitivo de los datos se realizará a posteriori por personal especializado. Sin embargo, será necesario realizar un control de calidad de los datos una vez finalizada cada estación, con el fin de comprobar que los sensores no han perdido sensibilidad y que no hay ningún tipo de interferencia con la señal de turbulencia natural que estamos midiendo.

## Control de calidad

Para el control de calidad de los datos se siguen los siguientes pasos:

### *Comparación del comportamiento espectral de los datos*





La utilidad *spectrum* del programa *DATpro* calcula y representa el espectro de fluctuación de velocidad turbulenta para diferentes rangos de profundidad a partir del perfil de cizalla, y permite una comparación visual con el espectro universal de Nasmyth. Al seleccionar los rangos de profundidad, es importante incluir una zona de alta turbulencia (superficie) y otra de baja turbulencia (termoclina), para comprobar el comportamiento de los datos en ambas zonas. No se deben mezclar zonas con diferente turbulencia. El espectro de las observaciones tiene que seguir, más o menos, la forma del espectro universal (Esquema 4 y Figura 9).

### *Comparación de la cizalla con la pseudo-cizalla (o pseudo-shear)*

Los sensores de cizalla son sensibles a las vibraciones del propio perfilador al descender a través de la columna de agua. Para detectar estas posibles perturbaciones se emplea el *pseudo-shear*, cociente entre la aceleración del sensor y la velocidad de caída del mismo, que mide únicamente turbulencias debidas a las vibraciones del perfilador. De este modo, comparando el *pseudo-shear* con la cizalla, se puede distinguir la turbulencia debida a las vibraciones del perfilador para aquellos casos en los que coincida el aumento de la cizalla y el *pseudo-shear* en la misma región.

ESQUEMA 4.

Modo de operación de la herramienta *spectrum* (acompañado de la Figura 9).

	El primer paso es seleccionar los archivos de entrada para aplicar esta herramienta, que serán los archivos de salida del primer <i>batch</i> . Para ello se utilizan la opción del menú “ <i>file→ select data path</i> ”, o el icono “ <i>select input folder</i> ”.
La lista de los archivos seleccionados se muestra en el cuadro de la esquina superior derecha de la ventana principal. Para realizar la representación gráfica se hace doble <i>clic</i> en un archivo de esa lista. Los sensores registrados en el archivo seleccionado se muestran en la ventana debajo de la lista de archivos.	
	La representación gráfica se configura a través del cuadro de diálogo de opciones (“ <i>open option dialogbox</i> ”). Las entradas de este cuadro de diálogo son autoexplicativas. Permite definir escalas y seleccionar los sensores que se quieren representar, que en este caso serán los sensores de cizalla <i>shear1</i> y <i>shear2</i> .
	Activar el icono “ <i>select data range</i> ” y, pulsando el botón izquierdo del ratón, arrastrar el cursor sobre los perfiles de cizalla para seleccionar el rango de profundidad del que se quiere calcular y representar el espectro. Dicho rango aparecerá marcado en gris.
	El icono “ <i>calculate spectrum</i> ” calcula y representa el espectro de fluctuación de velocidad turbulenta del rango seleccionado sobre el perfil de cizalla.

Para realizar esta comparación se emplea de nuevo la utilidad *spectrum*, pero en el cuadro de diálogo de opciones (“*open option dialogbox*”) se debe seleccionar el canal *pshear* y uno de los canales *shear* (*shear1* o *shear2*). Para detectar las posibles anomalías en el perfil *pshear* es útil la función *zoom* de la pantalla gráfica, que se activa del mismo modo que en la utilidad *cutgraf*. Situando el cursor sobre la anomalía, indica la profundidad a la que se ha registrado.

*Comparación entre sensores de cizalla*

Los sensores de cizalla *airfoil* también son sensibles a las partículas de cierto tamaño (por ejemplo, partículas de plancton) existentes en el agua. Cuando una partícula golpea el *airfoil*, el sensor registra una señal que dependerá de la masa de dicha partícula. Para separar la señal de turbulencia natural de este otro tipo de señales, el perfilador va equipado con dos sensores de cizalla alineados para medir la misma componente de cizalla. De este modo, los picos no coherentes en cada uno de los dos perfiles registrados de forma simultánea pueden ser identificados y eliminados.

El módulo *smooth* (Tabla 3) se encarga de comprobar la posible existencia de picos anómalos en los dos canales de tasa de disipación de energía cinética turbulenta (*eps1* y *eps2*) y calcular la media (*eps*). Cuando el



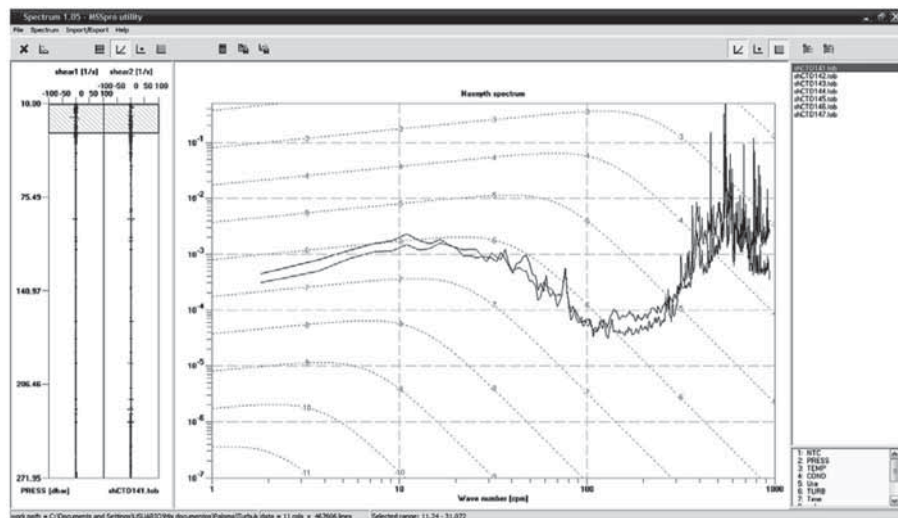


Figura 9. Ventana principal de la herramienta *spectrum*. En la parte izquierda de la pantalla se representan los perfiles de cizalla registrados por los dos sensores que incorpora el perfilador en una estación oceánica. En la parte central de la ventana la gráfica muestra el espectro de fluctuaciones de velocidad turbulenta correspondiente al rango seleccionado en los perfiles. En la Figura se observa cómo hasta la longitud de onda de 100 cpm las observaciones siguen el espectro universal de Nasmyth (isolíneas discontinuas).

valor de uno de los canales es mayor que el valor del otro canal en un factor establecido (normalmente factor  $n=5$ ), rechaza el valor mayor y se queda con el valor más bajo.

La utilidad *datgraf* del programa *DATpro* es muy útil para realizar una visualización rápida de los perfiles de datos, tanto para comprobar la correcta elección del factor  $n$ , como para evaluar con detalle los perfiles bajo determinadas condiciones oceánicas (abundancia de materia en suspensión, presencia de determinados organismos, etc.) que reducen la eficacia del módulo *smooth*.

Como se observa en la Figura 10, el pico que aparece en el canal *eps1* a 165 m de profundidad supera en  $n$  veces el valor de *eps2* a esa misma profundidad, con lo cual, el canal *eps* adoptará como válido el valor mínimo, y no la media de ambos.

En la Figura 11 se observa como la abundancia de medusas en una estación oceánica afecta al registro de datos en el sensor de cizalla situado en la posición más externa, y por tanto menos protegido. El impacto de estos organismos en el *airfoil* del sensor desvirtúa su señal de turbulencia a partir de los 60 metros de profundidad. A pesar del filtro que supone el módulo *smooth*, el criterio a seguir en estos casos es no tener en cuenta el



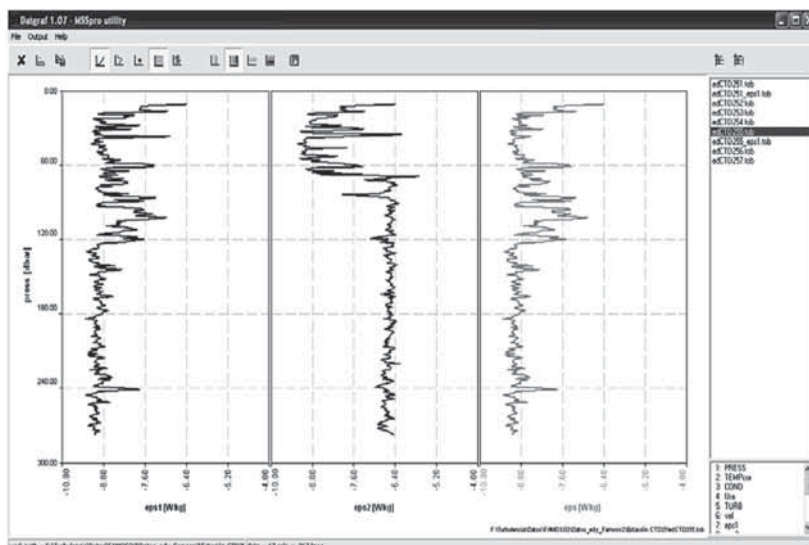


Figura 11. Distribución vertical de la tasa de disipación de energía cinética turbulenta ( $e$ ) calculada a partir de los datos de cizalla registrados por los dos sensores del perfilador en una estación oceánica con presencia importante de medusas, y de la tasa media calculada con el módulo *smooth*.

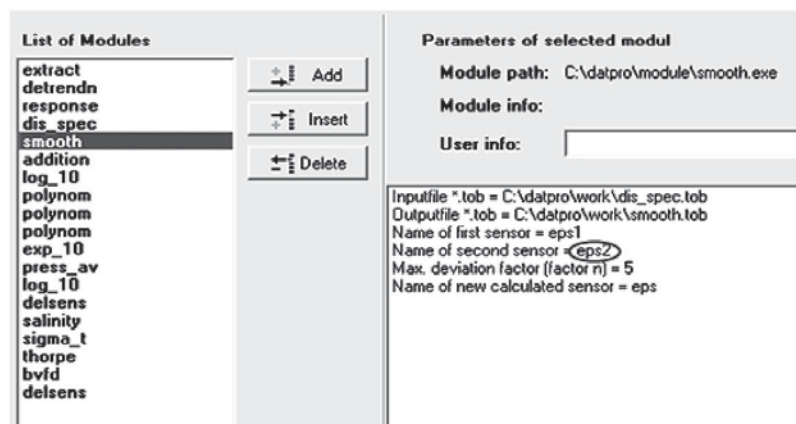


Figura 12. Pantalla de configuración del módulo *smooth*. Según el criterio establecido, habría que sustituir *eps2* (marcado con un círculo) por *eps1*.

perfil de ese sensor a la hora de calcular el valor medio  $eps$ , porque de lo contrario se estaría sobreestimando el valor de  $e$ . La manera más sencilla de hacerlo es seleccionar dos veces el canal *eps1* en el cuadro de configuración de parámetros del módulo (Figura 12).

## Referencias

- ALLEN, H. J., E. W. PERKINS. 1952. «A study effects of flow over slender inclined bodies of revolution». *U.S. National Advisory Committee for Aeronautics*, Report No. 1048.
- BATCHELOR, G. K. 1953. *The Theory of Homogeneous Turbulence*. Cambridge, UK: Cambridge University Press.
- KOLMOGOROV, A. N. 1941. «The local structure of turbulence in a incompressible viscous fluid for very high Reynolds number». *C.R. Acad. Sci. URSS* 30: 301-305.
- NEUMAN, T., H. PRANDKE. 1992. «Entwicklung eines Sensors zur Turbulenzmessung im Meer». University Rostock, Proceedings of the 7. Symposium Maritime Elektronik, Arbeitskreis Messelektronik, 81-84.
- OSBORN, T. R. 1980. «Estimates of the local rate of vertical diffusion from dissipation measurements». *J. Phys. Oceanogr.*, 10: 83-89.
- PRANDKE, H., S. STIPS. 1996. «Investigation of microstructure and turbulence in marine and limnic waters using de MST profiler». European Commission, Joint Research Centre, Space Applications Institute, Ispra, Technical note No. I.96.87.
- PRANDKE, H., S. STIPS. 1998. «Test measurements with an operational microstructure-turbulence profiler: Detection limit of dissipation rates». *Aquat. Sci.* 60: 191-209.
- PRANDKE, H. 2007. «Correction of the spatial response of shear sensors in dissipation rate computation procedure». ISW-Wassermesstechnik.
- PRANDKE, H. 2008. «Correction of the wave number cut off in dissipation rate computation procedure». ISW-Wassermesstechnik.
- RAHMSTORF, S. 2003. «The current climate». *Nature* 421: 699-699.
- SRIVER, R. L., M. HUBER. 2007. «Observational evidence for an ocean heat pump induced by tropical cyclones». *Nature* 447: 577-580.
- TERRAY, E. S., M. A. DONELAN, Y. C. AGRAWAL, W. M. DRENNAN, K. K. KAHMA, A. J. WILLIAMS III, P. A. HWANG, S. A. KITAIGORODSKII. 1996. «Estimates of kinetic energy dissipation under braking waves». *J. Phys. Oceanogr.* 26: 792-807.
- WOLK, F., H. YAMAZAKI, L. SEURONT, R. G. LUECK. 2002. «A new free-fall profiler for measuring biophysical microstructure». *J. Atmos. Ocean. Technol.* 19: 780-793.
- WUNSCH, C., R. FERRARI. 2004. «Vertical mixing, energy and the general circulation of the oceans». *Ann. Rev. Fluid Mech.* 36: 281-314.

# 3

## CONTAMINANTES Y DEPOSICIÓN ATMOSFÉRICA

---



## Muestreo de partículas marinas superficiales (5 m) para posterior análisis de compuestos orgánicos

<sup>1</sup>Dachs, J.; <sup>1</sup>Caballero, G.; <sup>1</sup>Morales, L.; <sup>1,2</sup>González, B.;  
<sup>1</sup>Fernández-Pinos, M. C.; <sup>1</sup>Abad, E.; <sup>2</sup>Jiménez, B.

<sup>1</sup>IDAEA (CSIC)  
<sup>2</sup>IQOG (CSIC)

### Finalidad. Campo de aplicación

Muestreo de partículas marinas mayores que 0.7 micras, aunque el muestreo es semi-cuantitativo para partículas más pequeñas que 0.7 micras. El objeto es recolectar la mayor cantidad de partículas marinas para el posterior análisis de compuestos orgánicos biogénicos y antropogénicos.

### Conceptos generales

La metodología permite el muestreo de material particulado de volúmenes de agua grandes (más de 100 L), con el fin de tener suficiente material para los análisis de compuestos orgánicos. La conservación de la muestra se realiza de manera que se asegura que esta no se contamina por contaminantes presentes en la atmósfera durante el transporte.

### Equipamiento necesario

La técnica se puede aplicar mediante dos procedimientos:

- A) Conectar el portafiltros directamente a la salida de agua del continuo del buque. Para esto se requiere
  - portafiltros de acero inoxidable para filtros de 14 cm.
  - conexiones de teflón.
- B) Conectar a un recipiente de acero inoxidable (bidón de 15 l) que recibe el agua del continuo del buque.

- portafiltros de acero inoxidable para filtros de 14 cm.
- conexiones de teflón.
- bomba peristáltica.

### Reactivos u otro material fungible

- Filtros GFF de 14 cm (Whatman), previamente acondicionados. Los filtros se muflan a 450 °C en el laboratorio durante 6 horas. Posteriormente se envuelven en papel de aluminio. Una vez a temperatura ambiente se taran y se numeran con el código correspondiente. Los filtros envueltos se guardan dentro de una bolsa zip de forma individual.
- Pinzas de acero inoxidable.
- Acetona de alta pureza.
- Pipetas Pasteur previamente mufladas y guardadas en papel de aluminio y bolsas zip.
- Papel de aluminio.
- Bolsas ZIP.

### Calibración

El flujo de agua (ml/min) que pasa por el filtro se mide regularmente (cada 30 o 45 min) empleando una probeta de 100 ml. Se controla el volumen de agua que pasa en un minuto. Se apunta este volumen en el estadi- llo de la muestra para el cálculo del flujo. Alternativamente se puede cali- brar con un medidor de flujo automático que a su vez debe ser calibrado adecuadamente.

### Descripción de la técnica

1. Se limpian previamente las pinzas y el portafiltros con acetona.
2. Se coge el filtro GFF de 15 mm y se coloca en el portafiltros de acero inoxidable. Este portafiltros está conectado al sistema de agua en continuo.
3. Se para la filtración cuando se colmata el filtro (caudales menores de 80 ml \* min<sup>-1</sup>).
4. Se abre el portafiltros y se dobla el filtro con unas pinzas previa- mente lavadas con acetona.
5. Se envuelve el filtro con su correspondiente papel de aluminio y se pone dentro de una bolsa zip cerrada herméticamente.
6. Se conservan los filtros congelados a -20 °C.



## Cuadro sinóptico de la técnica

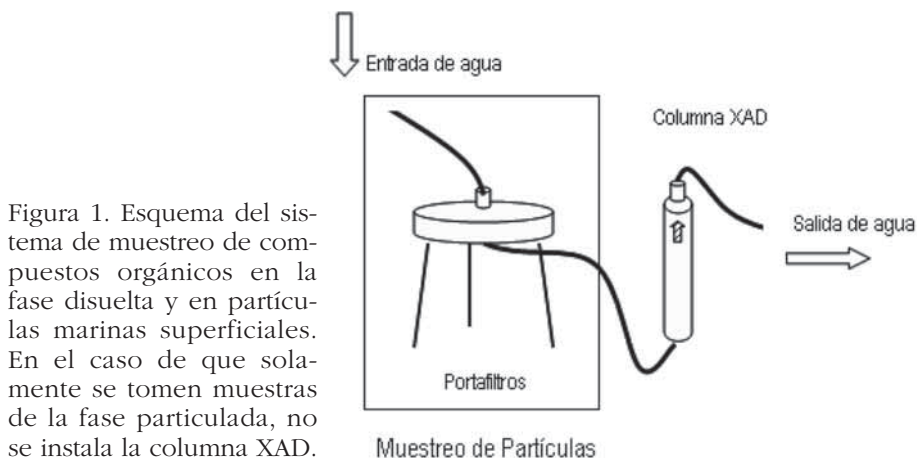
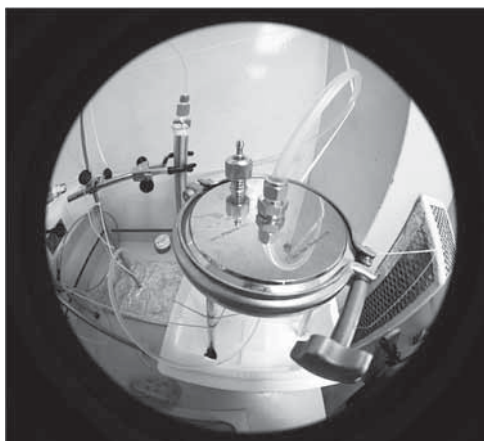


Figura 2. Sistema de muestreo de compuestos orgánicos en la fase disuelta y en partículas marinas superficiales.



## Cálculo de los resultados

El volumen se calcula integrando el flujo por todo el periodo de muestreo.

## Control de calidad

En zonas de mucho material particulado es necesario realizar la calibración del volumen con más asiduidad (cada 20 minutos).



## Muestreo de compuestos orgánicos en la fase disuelta y en partículas marinas superficiales (5 m)

<sup>1</sup>Dachs, J.; <sup>1</sup>Caballero, G.; <sup>1</sup>Morales, L.; <sup>1,2</sup>González, B.; <sup>1</sup>Fernández-Pinos, M. C.;  
<sup>1</sup>Ojeda, M. J. <sup>1</sup>Abad, E.; <sup>2</sup>Jiménez, B.

<sup>1</sup>IDAEA (CSIC)

<sup>2</sup>IQOG (CSIC)

### Finalidad. Campo de aplicación

Los compuestos orgánicos semi-volátiles se encuentran en la fase disuelta y particulada. Aquí se describe el muestreo conjunto de estas dos fases. La fase disuelta se concentra en un adsorbente, en concreto XAD-2. Muestreo de partículas marinas mayores que 0.7 micras, aunque el muestreo es semi-cuantitativo para partículas más pequeñas que 0.7 micras. El objeto es recolectar la mayor cantidad de partículas marinas para el posterior análisis de compuestos orgánicos biogénicos y antropogénicos.

### Conceptos generales

La metodología permite el muestreo de material particulado y la fase disuelta de volúmenes de agua grandes (más de 100 l), con el fin de tener suficiente material para los análisis de compuestos orgánicos. La conservación de la muestra se realiza de manera que se asegura que esta no se contamina por contaminantes presentes en la atmósfera durante el transporte.

### Equipamiento necesario

La técnica se puede aplicar mediante dos procedimientos:

- A) Conectar el portafiltros directamente a la salida de agua del continuo del buque. Para esto se requiere

- portafiltros de acero inoxidable para filtros de 14 cm.
- columna de acero inoxidable con XAD-2.
- conexiones de teflón.

B) Conectar a un recipiente de acero inoxidable (bidón de 15 l) que recibe el agua del continuo del buque.

- portafiltros de acero inoxidable para filtros de 14 cm.
- Columna de acero inoxidable con XAD-2.
- conexiones de teflón.
- bomba peristáltica.

### Reactivos u otro material fungible

- Filtros GFF de 14 cm (Whatman), previamente acondicionados. Los filtros se muflan a 450 °C en el laboratorio durante 6 horas. Posteriormente se envuelven en papel de aluminio. Una vez a temperatura ambiente se taran y se numeran con el código correspondiente. Los filtros envueltos se guardan dentro de una bolsa zip de forma individual.
- Pinzas de acero inoxidable.
- Acetona de alta pureza.
- Pipetas Pasteur previamente mufladas y guardadas en papel de aluminio y bolsas zip.
- Papel de aluminio.
- Bolsas ZIP.
- Columna de acero inoxidable, o teflón, rellena de XAD-2. Se guarda a 4 °C con metanol.

### Calibración

El flujo de agua que pasa por el filtro se mide regularmente (cada 30 o 45 min) mediante una probeta. Se controla el volumen de agua que pasa en un minuto. Se apunta este volumen en el estadillo de la muestra para el cálculo del flujo.

### Descripción de la técnica

Instalación de la columna XAD-2

1. Se limpian previamente las pinzas y el porta-filtros con acetona.
2. Se coge el filtro GFF de 140 mm y se coloca en el portafiltros de acero inoxidable. Este portafiltros está conectado al sistema de agua en continuo, o alternativamente a una bomba peristáltica.

3. Se coge una columna XAD-2 de la cámara frigorífica y se coloca entre la bomba peristáltica y el portafiltros.
4. Se regula el caudal a 200-300 ml min<sup>-1</sup> o el que dé la bomba peristáltica.
5. Se muestrean unos 200 l de agua.
6. Se mide regularmente el caudal de muestreo y se apunta en el estadillo.
7. Al final se cierra la columna por los dos lados, se etiqueta y se guarda en la cámara frigorífica a 4 °C (nunca a -20 °C).
8. Se abre el portafiltros y se dobla el filtro con unas pinzas previamente lavadas con acetona.
9. Se envuelve el filtro con papel de aluminio y se pone dentro de una bolsa zip cerrada herméticamente.
10. Se conservan los filtros congelados a -20 °C.

### Cuadro sinóptico de la técnica

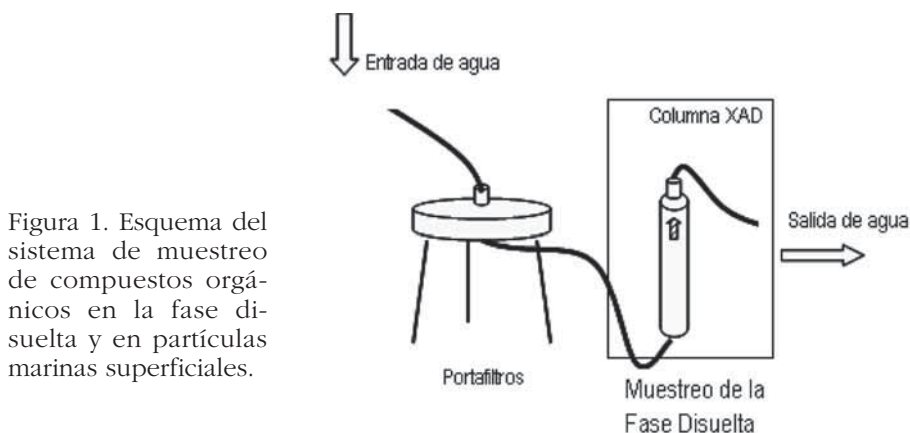


Figura 1. Esquema del sistema de muestreo de compuestos orgánicos en la fase disuelta y en partículas marinas superficiales.

### Cálculo de los resultados

El volumen se calcula integrando el flujo por todo el periodo de muestreo.

### Control de calidad

En zonas de mucho material particulado es necesario realizar la calibración del volumen con más asiduidad (cada 20 minutos).



# Muestreo de compuestos orgánicos en el agua de lluvia (deposición húmeda)

<sup>1,2</sup>González, B.; <sup>1</sup>Caballero, G., <sup>1</sup>Morales, L.; <sup>1</sup>Fernández-Pinos, M. C.;  
<sup>1</sup>Abad, E.; <sup>2</sup>Jiménez, B.; <sup>1</sup>Dachs, J.

<sup>1</sup>IDAEA (CSIC)

<sup>2</sup>IQOG (CSIC)

## Finalidad. Campo de aplicación

Los compuestos orgánicos semi-volátiles se encuentran de manera ubicua en la atmósfera por lo que en eventos lluviosos se ven arrastrados, con el resto de aerosoles, hacia la superficie de la Tierra. Aquí se describe la metodología para el muestreo de agua de lluvia para su posterior análisis en contenido de contaminantes orgánicos persistentes.

## Conceptos generales

La metodología permite el muestreo del agua de lluvia y su posterior tratamiento para aislar in situ los contaminantes orgánicos de interés gracias a técnicas de extracción en fase sólida (SPE) mediante sorbentes de fase reversa con balance hidrofílico – lipofílico (HLB).

## Equipamiento necesario

- Botella de 2.5 l.
- Embudo metálico.
- Equipo Baker: manifold para cartuchos SPE, adaptadores, capilares, matraz protege bombas y tubería adecuada.
- Bomba de vacío.

## Reactivos u otro material fungible

- Cartuchos Oasis HLB 3 cc (60 mg).
- Hexano.
- Diclorometano.
- Metanol.
- Agua para cromatografía de gases.
- Acetona.
- Surrogate de los compuestos a analizar.
- Viales con tapón de teflón ámbar de 22 ml.
- Pipetas Pasteur previamente mufladas y guardadas en papel de aluminio y bolsas zip.
- Papel de aluminio.
- Bolsas ZIP pequeñas.

## Calibración

Se apuntará en el estadillo la hora y lugar de recogida, además de cualquier otra incidencia meteorológica de interés. Para cada cartucho se determina el volumen de agua filtrado.

## Descripción de la técnica

Preparación del material.

1. Ante cualquier perspectiva de lluvia se limpia la botella y el embudo con acetona y se deja secar.
2. Se colocan en la parte superior del barco (puente) en una zona expuesta a la lluvia y se atan fuertemente.
3. Durante la lluvia, se puede montar el sistema de concentrado en el laboratorio conectando todos los elementos del Baker tal y como indica el esquema de las Figuras 1 y 2.
4. Se procede a acondicionar el cartucho añadiendo con una pipeta Pasteur:
  - a. 3ml de HX.
  - b. 3ml de DCM/HX (2:1).
  - c. 3ml de DCM/M (2:1 o 1:1).
  - d. 3ml de agua para cromatografía de gases.

La columna nunca debe secarse entre la carga de cada disolvente, pero tampoco deben mezclarse. Se recomienda el filtrado por gravedad para mayor lavado del cartucho.



### *Recogida de la muestra y concentrado*

1. Tras la lluvia se lleva la botella al laboratorio para su concentrado.
2. Se añaden los  $\mu\text{l}$  de surrogate adecuados a cada compuesto o familia de compuestos directamente en el agua de lluvia.
3. Pasar la muestra por el cartucho acondicionado mediante un capilar (previamente limpiado con acetona) hasta llevar a sequedad con ayuda del vacío.

### *Elución y almacenamiento*

1. Una vez secas se colocan las columnas sobre los viales en una gradilla y se sella la unión firmemente.
2. Se añaden:
  - a. 3 ml de HX.
  - b. 6 ml de DCM/HX (2:1).
  - c. 6 ml de DCM/M (2:1 o 1:1).

Con ayuda de una jeringa y un tapón se presiona para que comience a caer.

3. Una vez finalizada la elución de la muestra se almacenan los viales y el cartucho, bien etiquetados, a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ .
4. Se apunta toda la información sobre la recogida en el estadillo.

### **Cuadro sinóptico de la técnica**

#### *Acondicionado:*

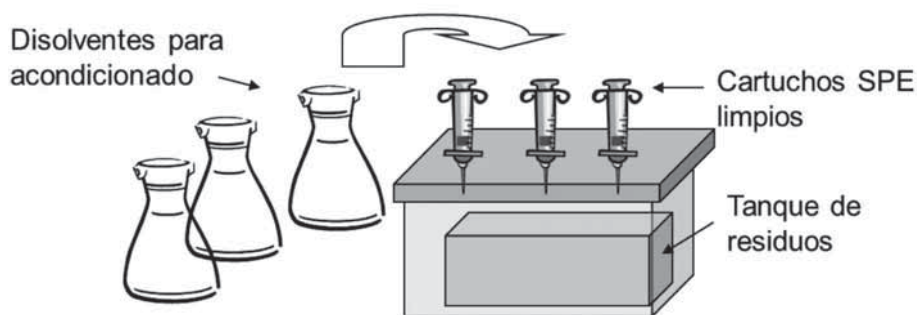
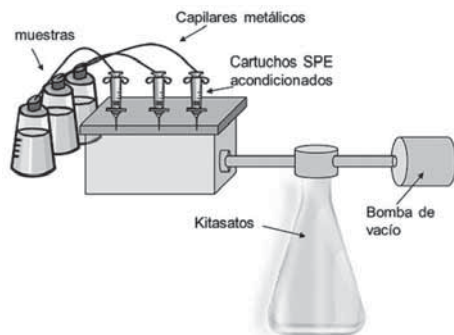


Figura 1. Esquema del sistema de acondicionado de los cartuchos SPE en un Baker.

Carga de muestras:



Elución:



Figura 2. Izquierda: esquema del sistema de carga de muestras en los cartuchos SPE en un Baker. Derecha: esquema del sistema de elución de muestras en los cartuchos SPE en un Baker.

## Cálculo de los resultados

Se calculará la concentración de contaminantes en el volumen de agua recogida en el muestreo y se relacionará con diferentes parámetros meteorológicos, concentraciones en atmósfera y superficie marina, etc.

## Control de calidad

Es necesario realizar los blancos de campo necesarios y se utilizarán patrones químicos de los contaminantes de interés para el control de la degradación por almacenaje o pérdidas en la manipulación.

# Muestreo de compuestos orgánicos en la atmósfera y estudio de su difusividad en agua marina (deposición seca)

<sup>1</sup>Caballero, G.; <sup>1</sup>Ojeda, M. J.; <sup>1</sup>Morales, L.; <sup>1,2</sup>González, B.; <sup>1</sup>Dachs, J.

<sup>1</sup>IDAIA (CSIC)

<sup>2</sup>IQOG (CSIC)

## Finalidad. Campo de aplicación

Los compuestos orgánicos semi-volátiles se encuentran de manera ubi-cua en la atmósfera y se difunden de manera natural hacia la superficie oceánica. Aquí se describe la metodología para la cuantificación de los flujos de contaminantes orgánicos persistentes hacia el agua del mar.

## Conceptos generales

La metodología se basa en la exposición de agua libre de contaminación orgánica persistente a la atmósfera oceánica y la posterior cuantificación de los flujos de entrada.

## Equipamiento necesario

- Bandeja de deposición.
- Probeta.
- Equipo kitasatos.
- Bidón metálico.

## Reactivos u otro material fungible

- Filtros: GF/D y GF/F de 47 mm y de nitrato de celulosa 0.2 µm de 47 mm.

- Acetona.
- Surrogate de los compuestos a analizar.
- Pipetas Pasteur previamente mufladas y guardadas en papel de aluminio y bolsas zip.
- Papel de aluminio.
- Bolsas ZIP pequeñas.

## Calibración

Se apuntará en el estadillo la hora y lugar de recogida, además de cualquier otra incidencia meteorológica de interés. Se utilizará agua convenientemente filtrada por un método validado.

## Descripción de la técnica

### *Preparación del material*

1. Se filtran 1.5 litros de agua procedente del sistema de captación continuo del barco por cada bandeja (hay que filtrar más agua ya que con los pasos se perderá, lo que interesa es tener un volumen final filtrado de 3 l) por medio del kitasatos primero con un filtro de 47 mm GF/F y después con uno de 47 mm de 0.2  $\mu\text{m}$  de nitrato de celulosa.
2. Guardamos el agua en los bidones metálicos a 4 °C.
3. Se limpian las bandejas con acetona y se dejan secar.
4. Ante la perspectiva de al menos 48 horas de tiempo sin precipitaciones y poco oleaje se colocan en la parte superior del barco (puente) en una zona expuesta y se atan fuertemente.
5. Con ayuda de una probeta vertemos el agua filtrada sobre ellas.
6. Deben permanecer las bandejas con el agua durante un tiempo de 2 días aproximadamente, en el caso de días muy cálidos se evaporará más rápido con lo que habrá que recoger y filtrar el agua antes. Si se prevé lluvia se ha de filtrar el agua antes de que llueva.

### *Recogida de la muestra y almacenado*

1. Se mide el volumen que no se ha evaporado con una probeta y se lleva al laboratorio.
2. Tras montar el equipo de filtrado kitasatos, se filtra primero en un filtro de 47 mm GF/D y después en uno de 47 mm GF/F.
3. Se almacenan los filtros doblados, envueltos en papel de aluminio y dentro de bolsas zip a -20 °C.

### Cuadro sinóptico de la técnica

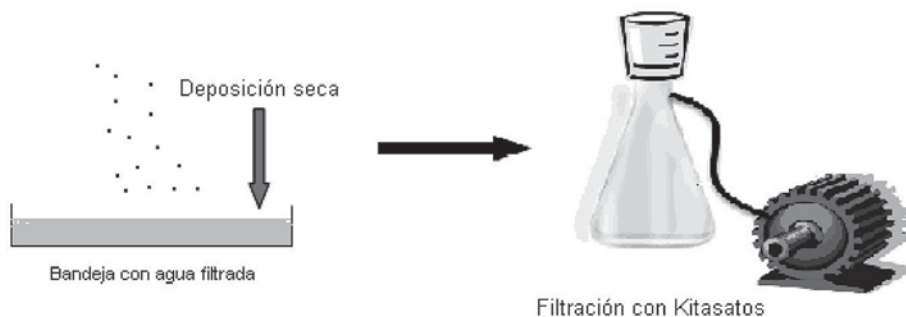


Figura 1. Bandeja de muestreo y esquema del equipo kitasatos.

### Cálculo de los resultados

Se calculará la concentración de contaminantes en el volumen de agua recogida en el muestreo y se relacionará con diferentes parámetros meteorológicos, concentraciones en atmósfera y superficie marina, etc. Al relacionarse con concentraciones medidas en aire, aerosoles y agua superficial de la zona del muestreo se podrán calcular los flujos de contaminantes a escala local.

### Control de calidad

Es necesario realizar los blancos de campo necesarios. Se realizan réplicas de las exposiciones.



## Muestreo de compuestos orgánicos fluorados en la fase disuelta y en partículas marinas superficiales (3 m y máximo profundo de clorofila)

González Gaya, B.; Jiménez, B.

*IQOG (CSIC)*

### Finalidad. Campo de aplicación

Los compuestos orgánicos fluorados semi-volátiles se encuentran en la fase disuelta y particulada del océano. Aquí se describe el muestreo conjunto de estas dos fases en agua tanto superficial como profunda (en este caso en la Profundidad de Máxima Productividad). La fase disuelta se concentra en un cartucho de *Weak Anion Exchange* (WAX). La fase particulada de partículas marinas mayores que 0.7 micras (aunque el muestreo es semi-cuantitativo para partículas más pequeñas que 0.7 micras) se recoge en un filtro GFF tras un filtrado mediante vacío en un kitasatos. El objeto es recolectar la mayor cantidad de partículas marinas en suspensión y disueltas para el posterior análisis de compuestos orgánicos fluorados biogénicos y antropogénicos.

### Conceptos generales

La metodología permite el muestreo de material particulado y la fase disuelta de volúmenes de determinadas zonas de la columna de agua, con el fin de tener suficiente material para los análisis de compuestos orgánicos a distintas profundidades y analizar su distribución. La conservación de la muestra se realiza de manera que se asegura que esta no se contamina durante el transporte.

## Equipamiento necesario

El equipamiento necesario se divide entre el sistema de extracción del agua de profundidad, el montaje de filtrado, el aparato de concentrado de la muestra disuelta y el fungible necesario para ambos y la recogida y almacenamiento de las muestras.

- Roseta: colección de botellas Niskin y CTD.
- 2 botellas de PP de 1 l.
- Bomba de vacío (2 o 1 con bifurcación).
- Equipo kitasatos: matraz Erlenmeyer de 1 l, embudo de filtración y cuerpo de filtración de placa de vidrio.
- Pinza de equipo de filtración.
- Colector bakerbond SPE de 12 ud.
- Probeta de 10 ml.

## Reactivos u otro material fungible

- Filtros GF/F de 47 mm (Whatman), previamente acondicionados. Los filtros se muflan a 450 °C en el laboratorio durante 24 horas. Se envuelven en papel de aluminio y dentro de una bolsa zip de forma individual.
- Pinzas de acero inoxidable.
- Acetona de alta pureza.
- Mix de PFC (estándar interno).
- Agua de amoníaco.
- Metanol de alta pureza.
- Agua destilada para cromatografía.
- Cartuchos WAX de 6 cc (OASIS).
- Pipetas Pasteur previamente mufladas y guardadas en papel de aluminio y bolsas zip.
- Papel de aluminio.
- Bolsas ZIP de PP.
- Cinta aislante (a usar como etiqueta).

## Calibración

Ninguno de los aparatos utilizados requiere calibrado, con excepción del CTD de la roseta, que será ajustado por el equipo UTM del barco.



## Descripción de la técnica

### *Extracción del agua de profundidad*

11. Evita teflón, goretex, polietileno y cualquier contacto con otras sustancias plásticas que puedan contaminar la muestra.
12. Enjuaga las botellas de PP con las que recogerás las muestras con metanol.
13. Toma un litro de agua de la roseta por cada profundidad disponible: una muestra superficial (entre 0 y 3 m) y una de la columna de agua (en el DCM) en sendas botellas de PP. Llena la botella al máximo, sin dejar aire dentro, para evitar pérdidas de los más volátiles (ej. FTOH).

### *Filtrado*

14. Filtra ambas muestras con un filtro GFF en un kitasatos ayudando al filtrado con una bomba de vacío. El filtro servirá para analizar el contenido de fluorados en la fase particulada. El agua servirá para analizar el contenido de fluorados disueltos.
15. Cuando finalice el filtrado añade los estándares a las muestras tanto al agua filtrada como a los filtros.

### *Recogida y almacenado del filtro*

16. Dobla el filtro con unas pinzas previamente lavadas con metanol, con la parte que ha recogido las partículas hacia dentro.
17. Envuelve el filtro con papel de aluminio y guardar dentro de una bolsa zip cerrada herméticamente.
18. Se conservan los filtros congelados a -20 °C.

### *Concentrado de la muestra disuelta*

19. Monta el colector Bakerbond SPE de 12 unidades (Baker) y acondiciona los cartuchos OASIS WAX (Taniyasu 2005) si no lo has hecho anteriormente. Lo ideal es que las muestras estén el mínimo tiempo posible en las botellas, por lo que se recomienda tener el Baker y los cartuchos preparados con antelación.
  - a. 4 ml 0.1%  $\text{NH}_4\text{OH}/\text{MeOH}$ .
  - b. 4 ml  $\text{MeOH}$ .
  - c. 4 ml Milli Q.
20. Lleva hasta el nivel de adsorbente del cartucho sin alcanzar la sequedad.

21. Carga la muestra, 1000 ml, siempre con presión de vacío pero a un flujo de goteo lento (1-2 gotas por segundo) (Ahrens et ál. 2009).
22. Hacer un blanco la primera vez que tomes muestra (**un blanco por cada leg!**) cargando 100 ml de agua Milli-Q y realizando el mismo proceso de concentrado y *storage* que con las muestras de agua de mar.
23. Añade 4 ml de agua Milli-Q antes del *dry point* para eliminar sales que puedan cristalizar al ser congeladas (Van Leewen, *direct communication*). En el blanco no es necesario.
24. Lleva a sequedad el cartucho, envuelve en papel de aluminio y congela a -20 °C en bolsitas de PP bien etiquetadas.

### Cuadro sinóptico de la técnica

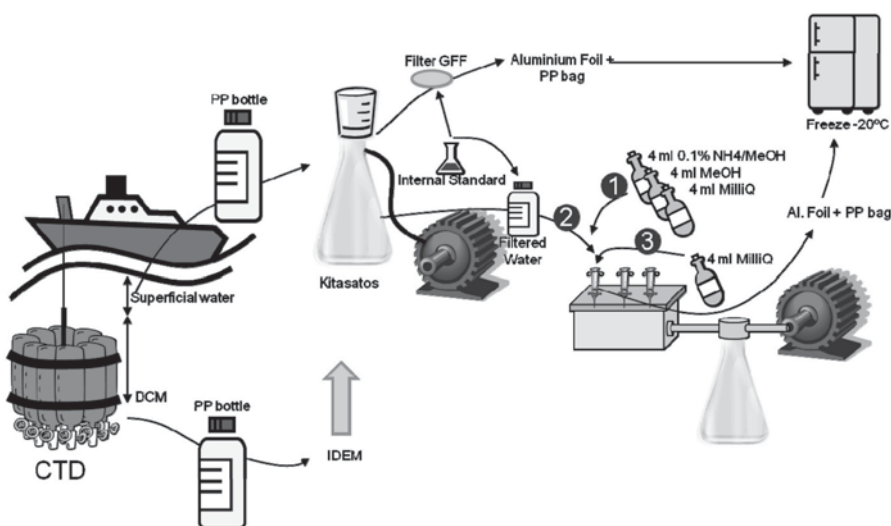


Figura 1. Esquema general del muestreo superficial y al DCM y posterior concentrado en el laboratorio.

### Cálculo de los resultados

En el laboratorio se realizará la extracción de los contaminantes del filtro y del agua y se efectuará la cuantificación y caracterización de los compuestos fluorados. Posteriormente los niveles de contaminantes obtenidos se relacionarán (en forma de concentración por volumen filtrado) con el volumen de agua recogida.

## Control de calidad

Se añade un estándar interno tanto al filtro como a la muestra de disuelto para calcular las pérdidas de contaminantes durante el proceso de concentrado y conservación. En laboratorio también se utilizarán estándares de inyección. Siempre se usan patrones marcados.

## Referencias

- TANIYASU, S., K. KANNAN, M. K. SO, A. GULKOWSKA, E. SINCLAIR, T. OKAZAWA, N. YAMASHITA. 2005. «Analysis of fluorotelomer alcohols, fluorotelomer acids, and short- and long-chain perfluorinated acids in water and biota». *J. Chromatogr. A* 1093, 89-97.
- AHRENS, L., Z. XIE, E. EBINGHAUS. 2009. «Distribution of perfluoroalkyl compounds in seawater from Northern Europe, Atlantic Ocean, and Southern Ocean». *Chemosphere* 78: 1011-1016.



## Muestreo de aerosoles

<sup>1</sup>Dachs, J.; <sup>1</sup>Caballero, G.; <sup>1</sup>Morales, L.; <sup>1,2</sup>González, B.,  
<sup>1</sup>Fernández-Pinos, M. C.; <sup>1</sup>Ojeda, M. J.; <sup>1</sup>Abad, E.; <sup>2</sup>Jiménez, B.

<sup>1</sup>IDAEA (CSIC)

<sup>2</sup>IQOG (CSIC)

### Finalidad. Campo de aplicación

Esta técnica permite el muestreo de la población general de aerosoles con tamaños de partícula mayores que 0.7  $\mu\text{m}$ , aunque aerosoles más pequeños (0.3-0.7  $\mu\text{m}$ ) pueden también muestrearse semi-cuantitativamente. Con esta técnica se pretende la recolección de muestras de aerosoles que permitan después el análisis de una gran variedad de compuestos (nutrientes, contaminantes orgánicos, carbonilla, materia orgánica, isótopos del S y el N, etc.).

### Conceptos generales

Los aerosoles presentan un vector importante para el transporte de materiales a larga distancia. Después del transporte atmosférico puede depositarse al océano y contribuir al ciclo de los nutrientes, carbono o contaminantes.

### Equipamiento necesario

El equipamiento necesario se divide entre el aparato de muestreo de aerosoles, y el fungible necesario para realizar el cambio de muestra.

- Captador de aerosoles de alto volumen.
- Cabezal para aerosoles TSP. Adaptado a filtros de 8 x 10 pulgadas.

El modo de funcionamiento de los captadores está descrito en el correspondiente manual.

## Reactivos u otro material fungible

- Filtros QMA de 8x10 pulgadas (Whatman), previamente acondicionados. Los filtros se muflan a 450 °C en el laboratorio durante 6 horas. Posteriormente se envuelven en papel de aluminio. Una vez a temperatura ambiente se taran y se numeran con el código correspondiente. Se guardan los filtros envueltos y dentro de una bolsa zip de forma individual.
- Pinzas de acero inoxidable.
- Acetona de alta pureza.
- Pipetas Pasteur previamente mufladas y guardadas en papel de aluminio y bolsas zip.
- Papel de aluminio.
- Bolsas ZIP.

## Calibración

La calibración del volumen de muestreo se realiza automáticamente por el aparato. El captador de aerosoles pasa una revisión por el fabricante anualmente, o antes de cada campaña, donde se comprueba esta auto-calibración siguiendo las normas ISO correspondientes.

## Descripción de la técnica

La instalación del captador de aerosoles se realiza en el sobre-puente. El captador está conectado a una veleta que desconecta el aparato cuando el aire viene de la mitad posterior del barco (afectado por los humos de este). El captador y la veleta deben estar bien atados/anclados para que no se muevan con el movimiento del barco.

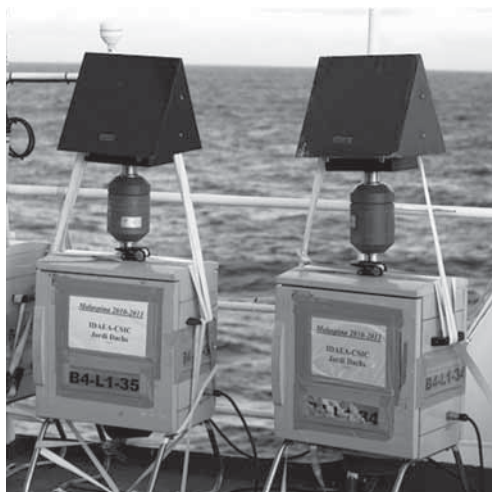


Figura 1. Captadores de alto volumen (CAV).

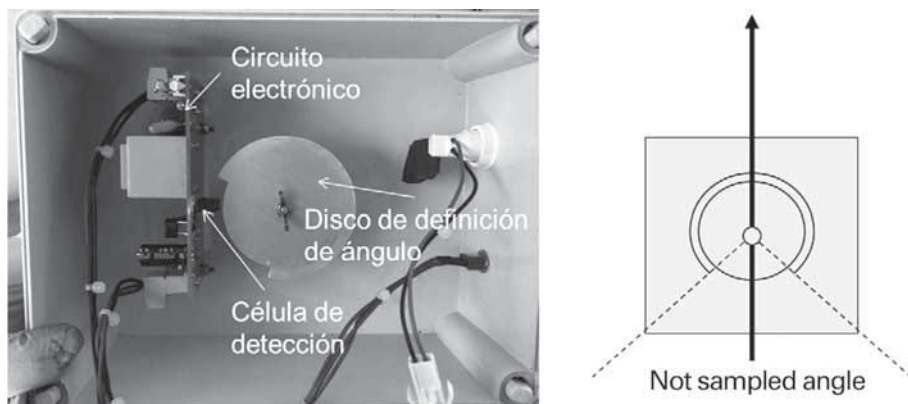


Figura 2. Esquema del funcionamiento de la veleta en el sistema de muestreo.

### *Proceso de cambio de filtro*

1. Se limpian previamente las pinzas con acetona.
2. Se desenvuelven los filtros. El papel de aluminio se guarda preferiblemente en una bolsa de plástico.
3. Con las dos pinzas limpias se coge el filtro y se pone en el cabezal porta-filtros del captador de aerosoles.
4. Se programa el aparato para filtrar  $40 \text{ m}^3/\text{hora}$  de aire durante 48 horas.
5. Al empezar, se ha de tomar nota del volumen total de aire que indica el aparato y el número de filtro.
6. Después de 48 horas se abre el cabezal porta filtros, se saca el filtro con las pinzas y se dobla por la mitad (con los aerosoles hacia dentro). Finalmente se envuelve el filtro con papel de aluminio.
7. Los filtros envueltos se guardan dentro de bolsas de plástico y congelados a  $-20^\circ\text{C}$ .

### **Cálculo de los resultados**

El único cálculo a realizar es el del volumen de aire muestreado, que se realiza por la sustracción de la lectura de volumen inicial a la del volumen final.

### **Control de calidad**

En control de calidad de la lectura del volumen se realiza por el fabricante. En el caso de muestreadores antiguos hay que corregir el volumen muestreado utilizando la ecuación de los gases.





## Muestreo de aerosoles PM 2.5

<sup>1</sup>Caballero, G.; <sup>1</sup>Morales, L.; <sup>1,2</sup>González, B.; <sup>1</sup>Fernández-Pinos, M. C.;  
<sup>1</sup>Ojeda, M. J.; <sup>1</sup>Abad, E.; <sup>1</sup>Dachs, J.; <sup>2</sup>Jiménez, B.

<sup>1</sup>IDAEA (CSIC)

<sup>2</sup>IQOG (CSIC)

### Finalidad. Campo de aplicación

Esta técnica permite el muestreo de la población de aerosoles con tamaños de partícula mayores que 0.7  $\mu\text{m}$  y menores que 2.5  $\mu\text{m}$ , aunque aerosoles más pequeños (0.3-0.7  $\mu\text{m}$ ) pueden también muestrearse semicuantitativamente. Con esta técnica se pretende la recolección de muestras de aerosoles que permitan después el análisis de una gran variedad de compuestos (nutrientes, contaminantes orgánicos, carbonilla, materia orgánica, isótopos del S y el N, etc.).

### Conceptos generales

Los aerosoles presentan un vector importante para el transporte de materiales a larga distancia. Después del transporte atmosférico puede depositarse al océano y contribuir al ciclo de los nutrientes, carbono o contaminantes. El muestreo de aerosoles pequeños permite evitar el muestreo de los aerosoles de mayor tamaño y así centrarse en los aerosoles con mayor capacidad de transporte y que tienen un impacto en la salud humana mayor.

### Equipamiento necesario

El equipamiento necesario se divide entre el aparato de muestreo de aerosoles y el fungible necesario para realizar el cambio de muestra.

- Captador de aerosoles de alta capacidad
- Cabezal para aerosoles PM 2.5. Adaptado a filtros de 15 cm de diámetro.

El modo de funcionamiento de los captadores está descrito en el correspondiente manual.



Figura 1. Captadores de alto volumen para PM2.5.

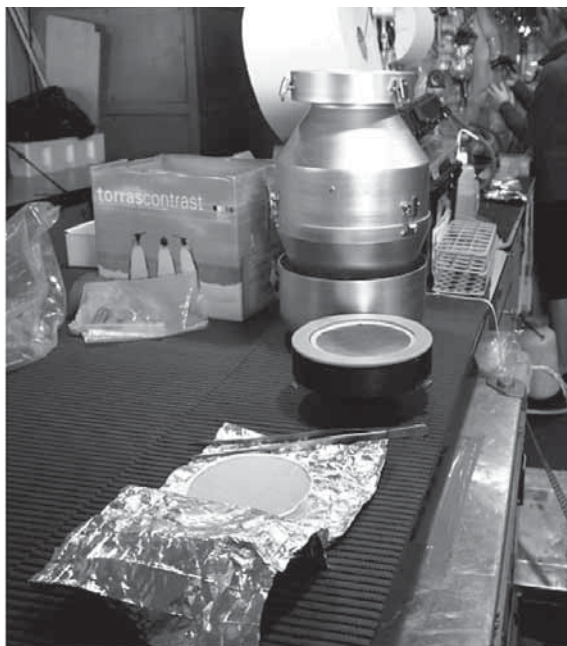


Figura 2. Muestra, portafiltros y cabezal filtrados de PM 2.5.

### Reactivos u otro material fungible

- Filtros GFF de 15 cm (Whatman), previamente acondicionados. Los filtros se envuelven en papel de aluminio y se muflan a 450 °C en el laboratorio durante 6 horas. Una vez a temperatura ambiente se taran y se numeran con el código correspondiente. Se guardan los filtros envueltos y dentro de una bolsa zip de forma individual.
- Pinzas de acero inoxidable.
- Acetona de alta pureza.
- Pipetas Pasteur previamente mufladas y guardadas en papel de aluminio y bolsas zip.
- Papel de aluminio.
- Bolsas ZIP.

## Calibración

La calibración del volumen de muestreo se realiza automáticamente por el aparato. El captador de aerosoles pasa una revisión por el fabricante anualmente donde se comprueba esta auto-calibración siguiendo las normas ISO correspondientes.

## Descripción de la técnica

La instalación del captador de aerosoles se realiza en el sobre-puente. El captador está conectado a una veleta que desconecta el aparato cuando el aire viene de la mitad posterior del barco (afectado por los humos de este). El captador y la veleta deben estar bien atados/anclados para que no se muevan ni un milímetro con el movimiento del barco.

### *Proceso de cambio de filtro*

1. Se limpian previamente las pinzas con acetona.
2. Se desenvuelve los filtros. El papel de aluminio se guarda preferiblemente en una bolsa de plástico.
3. Con las dos pinzas limpias se coge el filtro y se pone en el cabezal porta-filtros del captador de aerosoles.
4. Se programa el aparato para filtrar 40 m<sup>3</sup>/hora de aire durante 48 horas.
5. Al empezar, tomar nota del volumen total de aire que indica el aparato y el número de filtro.
6. Después de 48 horas se abre el cabezal portafiltros, se saca el filtro con las pinzas y se dobla por la mitad (con los aerosoles hacia dentro). Finalmente se envuelve el filtro con papel de aluminio.
7. Los filtros envueltos se guardan dentro de bolsas de plástico y congelados a -20 °C.

## Cálculo de los resultados

El único cálculo a efectuar es el del volumen de aire muestreado, que se realiza por la sustracción de la lectura de volumen inicial a la del volumen final.

## Control de calidad

El control de calidad de la lectura del volumen se realiza por el fabricante. En el caso de muestreadores viejos, o según el fabricante, hay que corregir el volumen muestreado utilizando la ecuación de los gases para corregir por temperatura.



## Muestreo de aerosoles (TSP) y compuestos semi-volátiles en la fase gas

<sup>1,2</sup>González, B.; <sup>1</sup>Caballero, G.; <sup>1</sup>Morales, L.; <sup>1</sup>Fernández-Pinos, M. C.; <sup>1</sup>Ojeda, M. J.;  
<sup>1</sup>Galbán-Malagón, C.; <sup>1</sup>Zúñiga, J.; <sup>1</sup>Abad, E.; <sup>1</sup>Dachs, J.; <sup>2</sup>Jiménez, B.

<sup>1</sup>IDAEA (CSIC)

<sup>2</sup>IQOG (CSIC)

### Finalidad. Campo de aplicación

Esta técnica permite el muestreo de la población de aerosoles con tamaños de partícula mayores que 0.7  $\mu\text{m}$ , aunque aerosoles más pequeños (0.3-0.7  $\mu\text{m}$ ) pueden también muestrearse semi-cuantitativamente. Además se muestrean simultáneamente los compuestos semi-volátiles que se encuentran en la fase gas.

Con esta técnica se pretende la recolección de muestras de aerosoles que permitan después el análisis de contaminantes orgánicos simultáneamente en la fase aerosol y la fase gas.

### Conceptos generales

Los contaminantes orgánicos persistentes son semivolátiles, hidrofóbicos y tienen capacidad para el transporte a larga distancia. Su presencia en la atmósfera hace que se hayan transportado a todas las zonas del planeta e impactan los ecosistemas cuando entran en estos mediante deposición atmosférica. El muestreo simultáneo de las fases gas y aerosol permite su determinación en la atmósfera y separar las dos fases es importante para entender y predecir la manera por la que se depositan, y así entran en los ecosistemas.

## Equipamiento necesario

El equipamiento necesario se divide entre el aparato de muestreo de aerosoles (con el porta-espumas para la fase gas) y el fungible necesario para realizar el cambio de muestra.

- Captador de aerosoles de alta capacidad.
- Cabezal para aerosoles TSP Adaptado a filtros de 8x10 pulgadas.
- Porta-espumas para espumas de 10 cm de diámetro y 10 cm de largo.

El modo de funcionamiento de los captadores está descrito en el correspondiente manual.



Figura 1. Captadores de alto volumen (CAV).

## Reactivos u otro material fungible

- Filtros GFF de 15 cm (Whatman), previamente acondicionados. Los filtros se envuelven en papel de aluminio y se muflan a 450 °C en el laboratorio durante 6 horas. Una vez a temperatura ambiente se taran y se numeran con el código correspondiente. Se guardan los filtros envueltos y dentro de una bolsa zip de forma individual.
- Espumas de poliuretano de 10 cm de diámetro y 10 cm de largo. Las espumas han sido previamente extraídas con acetona/hexano en Soxlet por 24 horas. Se han secado al vacío en un desecador y guardado envueltas en papel aluminio y bolsas zip.

- Pinzas grandes y pequeñas de acero inoxidable.
- Acetona de alta pureza.
- Pipetas Pasteur previamente mufladas y guardadas en papel de aluminio y bolsas zip.
- Papel de aluminio.
- Bolsas ZIP.

## Calibración

La calibración del volumen de muestreo se realiza automáticamente por el aparato. El captador de aerosoles pasa una revisión por el fabricante anualmente donde se comprueba esta auto-calibración siguiendo las normas ISO correspondientes.

## Descripción de la técnica

La instalación del captador de aerosoles se realiza en el sobre-puente. El captador está conectado a una veleta que desconecta el aparato cuando el aire viene de la mitad posterior del barco (afectado por los humos de este). El captador y la veleta deben estar bien atados/anclados para que no se muevan con el movimiento del barco. En el caso de que se instale el porta-espumas, el anclaje del sistema es especialmente importante ya que el captador con porta-espumas y porta-filtros es muy alto y se mueve fácilmente.



Figura 2. Cabezal y espuma para CAV.

### *Proceso de cambio de espuma*

1. Se limpian previamente las pinzas con acetona y el porta-espumas también con acetona.
2. Se desenvuelve la espuma y se coge con la pinza grande.
3. Se inserta la espuma en el porta-espumas de vidrio, se inserta este en el porta-espumas de PCV.
4. Se coloca el porta-espumas entre el muestreador CAV y el portafiltros.
5. Se programa el aparato para filtrar 40 m<sup>3</sup>/hora de aire durante 24 horas.
6. Al empezar, tomar nota del volumen total de aire que indica el aparato y el número de filtro.
7. Después de 24 horas se abre el cabezal portafiltros, se saca el filtro con las pinzas y se dobla por la mitad (con los aerosoles hacia dentro). Finalmente se envuelve el filtro con papel de aluminio. Se saca la espuma con la pinza previamente lavada con acetona y se envuelve con papel de aluminio. Después se guarda dentro de dos bolsas zip. Importante que esté cerrado herméticamente.
8. Los filtros y espumas envueltos se guardan dentro de bolsas de plástico y congelados a -20 °C.

### *Proceso de cambio de filtro*

1. Se limpian previamente las pinzas con acetona.
2. Se desenvuelve los filtros. El papel de aluminio se guarda preferiblemente en una bolsa de plástico.
3. Con las dos pinzas limpias se coge el filtro y se pone en el cabezal porta-filtros del captador de aerosoles.
4. Se programa el aparato para filtrar 40 m<sup>3</sup>/hora de aire durante 48 horas.
5. Al empezar, tomar nota del volumen total de aire que indica el aparato y el número de filtro.
6. Después de 48 horas se abre el cabezal portafiltros, se saca el filtro con las pinzas y se dobla por la mitad (con los aerosoles hacia dentro). Finalmente se envuelve el filtro con papel de aluminio.
7. Los filtros envueltos se guardan dentro de bolsas de plástico y congelados a -20 °C.
8. IMPORTANTE – Apuntar al final el volumen de aire filtrado.
9. Comprobar que el “estadillo” está correctamente relleno. Todas las casillas de la fila de la muestra deben contener datos.
10. IMPORTANTE – Después de la campaña, las muestras deben permanecer congeladas hasta que lleguen al puerto de destino.



### Cuadro sinóptico de la técnica

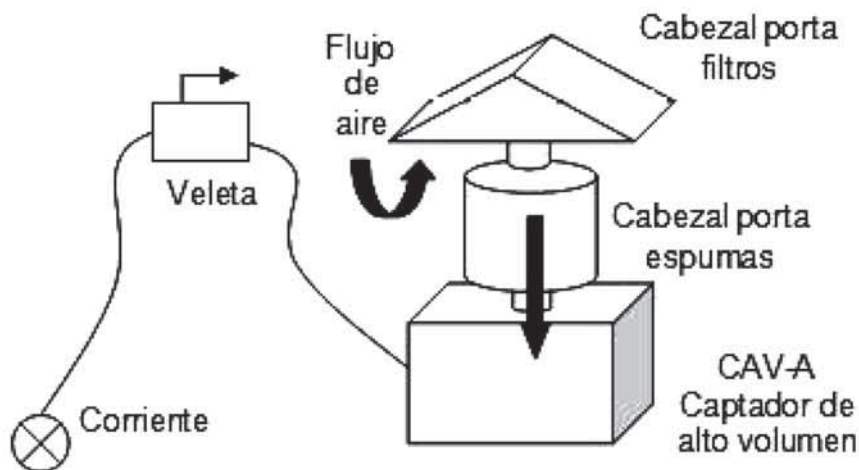


Figura 3. Esquema del sistema para el muestreo de aerosoles (TSP) y compuestos semi-volátiles en la fase gas.

### Cálculo de los resultados

El único cálculo a realizar es el del volumen de aire muestreado, que se realiza por la sustracción de la lectura de volumen inicial a la del volumen final.

### Control de calidad

El control de calidad de la lectura del volumen se realiza por el fabricante. En el caso de muestreadores viejos hay que corregir el volumen muestreado utilizando la ecuación de los gases.



# Toma de muestras de bioaerosoles

Arrieta, J. M.; García-Zarandona, I.; Mayol, E.

*Instituto Mediterráneo de Estudios Avanzados (UIB-CSIC)*

## Finalidad. Campo de aplicación

Metodología para desarrollar un muestreo de aportes atmosféricos de origen biológico (bioaerosoles) utilizando un captador comercial (Coriolis- $\mu$ ).

## Conceptos generales

El muestreo de aportes atmosféricos de origen biológico (bioaerosoles) pretende proporcionar datos sobre la abundancia, calidad y procedencia de la fracción biológica de los aerosoles atmosféricos. Los datos que existen al respecto son muy pocos, aunque existen indicios que apuntan a una gran importancia de estas partículas biológicas como núcleos de condensación y formación de partículas de hielo en la atmósfera. Por otro lado, estudios recientes indican que el transporte atmosférico podría ser un mecanismo importante de dispersión de poblaciones microbianas, contribuyendo así a la mantención de la diversidad microbiana en sistemas acuáticos.

## Equipamiento necesario

- Captador de aerosoles (Coriolis- $\mu$ , Bertin Technologies).
- Material lavado con ácido.
  - Al menos 30 min en solución de HCl 0.12N, mejor varias horas y después enjuagado con agua ultrapura (calidad Milli-Q) al menos dos veces.
  - copas para el tomador de muestra (mínimo 2).
  - cabezal de entrada de aire.

- tubo de silicona de la bomba peristáltica del captador de aerosoles.
- botella de 250 ml para el captador de aerosoles.
- Pipetas automáticas cubriendo el rango de 20  $\mu$ L a 10 ml con sus puntas correspondientes. Mejor utilizar puntas con filtro cuando sea posible.
- 2 sistemas de filtración para filtros de 25 mm de diámetro. Uno se usará para muestras fijadas y otro para recolección de ADN.

### Reactivos u otro material fungible

- Agua ultrapura (calidad Milli-Q).
  - La pureza del agua en cuanto a materiales disueltos no es tan importante como la ausencia total de partículas. Muchos sistemas de producción de agua de laboratorio comerciales producen agua filtrada por 0.2  $\mu$ m de calidad suficiente. Es importante asegurar que el filtro funciona adecuadamente (examinando una muestra al microscopio o citómetro de flujo) y que el agua utilizada tanto para la preparación de reactivos como para la limpieza del equipo está totalmente libre de partículas. En caso de duda se recomienda usar un sistema de filtración adicional.
- Solución de Triton X-100 5% (5 g en volumen final de 100 ml), preparada en agua libre de partículas. Se puede almacenar en nevera ( $\sim 4$  °C) durante semanas.
  - Solución de trabajo de Triton X-100 al 0.005% preparada a partir de la solución anterior (mezclando 1 ml en 1 l de agua libre de partículas. Se puede almacenar en nevera durante unos 4-5 días en una botella previamente lavada con HCl. Se necesitarán aproximadamente 250 ml de esta solución para cada muestreo.
- Formaldehído 37%.
- Paraformaldehído 10%.
  - La solución se prepara disolviendo 100 g de paraformaldehído en 800 ml de agua ultrapura caliente ( $\sim 90$  °C) con agitación constante (dentro de una campana extractora). Para acelerar la disolución añadir un 1 ml de NaOH 10M y dejar disolver con agitación constante durante una o dos horas. Una vez disuelto, añadir 100 ml de PBS (Sigma P4417), ajustar el pH a  $\sim 7.6$  y filtrar a través de filtros de 0.2  $\mu$ m. Alicuotar en volúmenes adecuados a la frecuencia de muestreo y almacenar congelado ( $-20$  °C) a largo plazo. Descongelar y filtrar de nuevo con un filtro de jeringuilla y almacenar a 4 °C. Una vez descongelado debe utilizarse en un plazo máximo de una semana.
- Aceite de inmersión no fluorescente para microscopía de epifluorescencia.

- Filtros de policarbonato negros de 25 mm de diámetro y 0.2  $\mu\text{m}$  de tamaño de poro.
- Filtros de policarbonato blancos de 25 mm de diámetro y 0.2  $\mu\text{m}$  de tamaño de poro.
- Crioviales de 2 ml.

## Calibración

El flujo de aire debe ser calibrado regularmente por la empresa que manufactura el aparato (Bertin Technologies).

## Descripción de la técnica

El captador de aerosoles se colocará en un lugar elevado, a proa del barco, de forma que no haya estructuras del barco más elevadas más a proa. El muestreo comenzará una vez finalizadas todas las maniobras de la estación cuando el barco se encuentre en movimiento para asegurarnos de que solo se capta aire no contaminado por materiales provenientes del barco.

Se utilizará un cabezal, copas de muestreo, tubo de silicona y botella de líquido de recolección (250 ml) limpias cada día y lo montaremos en el captador justo antes de comenzar el muestreo para evitar contaminaciones.

Cada día se estimará la tasa de adición de líquido de muestreo y se tomará un blanco para comprobar la ausencia de contaminación en reactivos y materiales en contacto con la muestra.

El protocolo de muestreo se divide en 5 fases:

1. Estima del volumen de líquido añadido inicialmente a la copa (es necesario hacerla todos los días ya que puede cambiar al cambiar el tubo de muestreo y la temperatura). Consiste en incoar el captador y pararlo al cabo de dos minutos cuando ha acabado de añadir líquido.

Parámetros del captador:

- flujo de aire 300 l/min.
- Duración: 2 min.
- Inyección: FIXE.
- Volumen: 00 ml/min.

Se mide el volumen de líquido dentro del cono utilizando la pipeta de 10 ml. Se pipetea el líquido fuera del cono con la pipeta de 10 ml hasta que la cantidad restante sea menor de 10 ml. Si el volumen remanente aproximado es por ejemplo 5 ml, poner la pipeta en 4 ml y después girar el mando de control de volumen, subiendo el volumen hasta aspirar todo el líquido. En la práctica habrá una capa de espuma encima del líquido, se aspira todo el líquido y hasta justo antes de que comience a entrar espuma en la pipeta, se suma el volumen que marca la pipeta al volumen extraído previamente y para

calcular el volumen inicial de líquido añadido por el aparato ( $V_i$ ). Este líquido se puede tirar.

2. Estima del volumen de líquido evaporado (es necesario hacerla todos los días, ya que dependerá de la temperatura y humedad relativa del aire). Ponemos un cono limpio en el aparato y lo ponemos en marcha.

Parámetros del captador:

- flujo de aire 300 l/min.
- Duración: 12 min.
- Inyección: FIXE.
- Volumen: 00 ml/min.

Al acabar la recolección, medir la cantidad de líquido restante como en el paso anterior y anotar el volumen final ( $V_f$ ), la diferencia entre  $V_i - V_f$  es la tasa de evaporación correspondiente a 10 minutos en las condiciones de temperatura y humedad de ese día. Este líquido se puede tirar. Con estos datos calcular la tasa de evaporación  $E$ .

$$E = \frac{(V_i - V_f)}{10} \text{ en ml/min}$$

3. Toma de una muestra de aire durante solo dos minutos como blanco (la cantidad de bacterias recogidas en solo dos minutos debería ser indetectable con los métodos que usamos, si vemos bacterias en esta muestra nos encontraríamos ante una contaminación). Procesar esta muestra del mismo modo que la muestra real que se obtendrá en el paso 4.

Parámetros del aparato:

- flujo de aire 300 l/min.
- Duración: 2 min.
- Inyección: FIXE.
- Volumen: 00 ml/min.

4. Iniciar la toma de muestra real en un cono limpio durante 6 horas.

Parámetros del aparato:

- flujo de aire 300 l/min.
- Duración: 360 min.
- Inyección: FIXE.
- Volumen:  $E$  ml/min (donde  $E$  es la tasa de evaporación calculada en el paso 2).

5. Procesado de la muestra.

Una vez obtenida la muestra, y tan pronto como sea posible para evitar contaminaciones y crecimiento de los microorganismos procesar la muestra como se detalla a continuación.

Las muestras recogidas en los conos (tanto los blancos de la fase 3 como las muestras de la fase 4) se procesan de la siguiente manera. En

primer lugar, ajustar el volumen de muestra hasta aproximadamente 15 ml (leer el volumen por debajo de la capa de espuma, usando las graduaciones aproximadas del cono). Para ajustar el volumen, podemos usar solución de muestreo o agua filtrada. Mezclar bien.

La muestra se dividirá entonces para ser utilizada en tres técnicas diferentes.

### **Abundancia bacteriana por microscopía de epifluorescencia**

Tomar 5 ml de muestra y ponerlos en un tubo de polipropileno de 13 ml. Añadir 5 gotas de formaldehído 37% utilizando una jeringa con filtro. La concentración final de formaldehído no es tan crítica como la necesidad de evitar contaminación particulada.

Mezclar bien y dejar fijar durante al menos 10 minutos en oscuridad. Si no hay tiempo, esta muestra se puede almacenar durante un máximo de 24 h a 4 °C.

Después de fijar la muestra, añadir DAPI al tubo (10 µL por ml de muestra), mezclar y dejar teñir durante 10 minutos en oscuridad.

Mientras tanto, lavar la parte superior de la columna de filtración diariamente con agua filtrada antes de comenzar la filtración para evitar contaminaciones. Entre filtraciones, almacenar las columnas de vidrio de la filtración en HCl del utilizado para la limpieza del material.

Montar un filtro de policarbonato de 0.22 µm de tamaño de poro (filtros negros) con la cara brillante hacia arriba en el sistema de filtración.

Transcurridos los 10 minutos de tinción, filtrar todo el líquido, lavar el tubo dos veces con 2-3 ml de agua filtrada y filtrar esta agua también para recoger todas las bacterias que queden en el tubo (utilizar una jeringuilla con filtro para añadir el agua).

Preparar un portaobjetos, marcado con la fecha de la muestra, su número de serie y si es blanco o muestra, poner una gota de aceite de inmersión más o menos en el centro del porta. Poner el filtro encima de esta gota con la cara brillante hacia arriba (la cara que tiene las bacterias), otra gota de aceite de inmersión encima del filtro, y por último un cubreobjetos encima del filtro con cuidado de no atrapar burbujas de aire entre el cubre y el filtro. Encima de una superficie sólida y plana, presionar el cubre firmemente contra el filtro con un trozo de papel seca manos y finalmente almacenar la preparación a -20 °C en las cajas de almacenaje de portas.

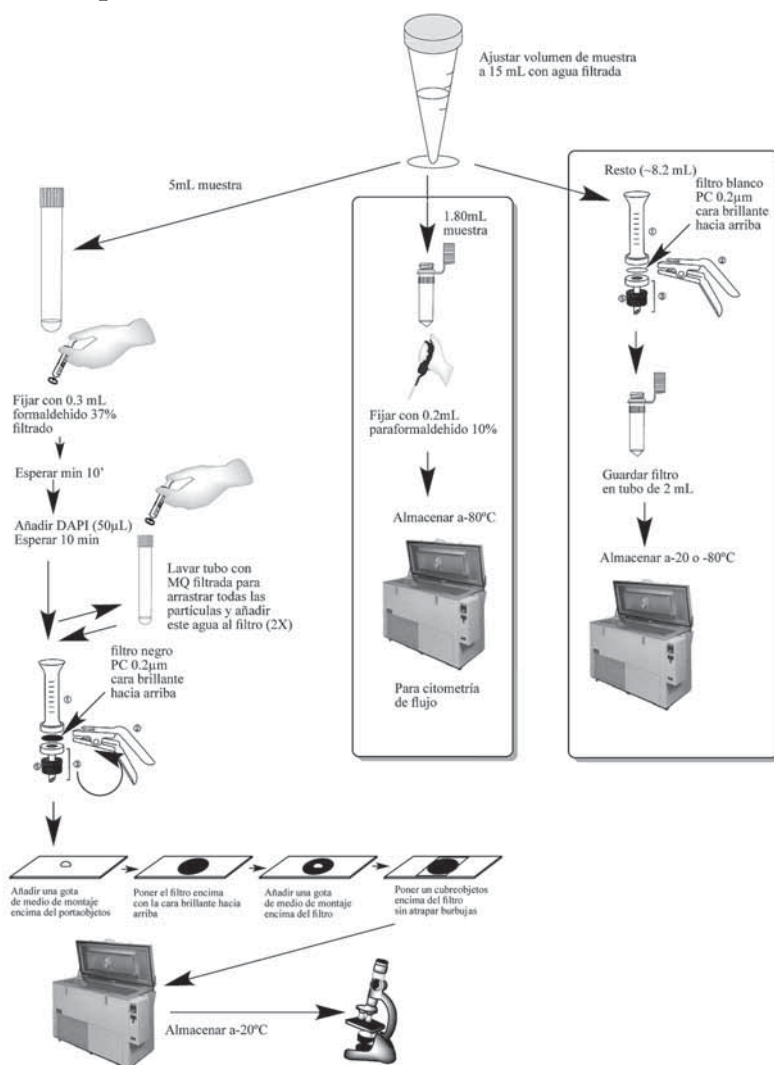
### **Abundancia de bacterias y otras partículas biológicas por citometría de flujo**

Pipetear 1.8 ml de muestra en un criotubo de 2 ml. Añadir 0.2 ml de paraformaldehído 10%, mezclar, dejar fijar durante 10 min y almacenar a -80 °C. Esta muestra no puede esperar.

## Muestra de ADN para identificación de microorganismos por técnicas moleculares

Esta muestra tampoco puede esperar. Filtrar el resto de la muestra sobre un filtro blanco de policarbonato de 0.22  $\mu\text{m}$ . Guardar el filtro en un criotubo de 2 ml y congelar a -20 o -80 °C. Lavar la columna de filtración con ácido cada vez, usar siempre guantes y unas pinzas limpias para manipular los filtros.

### Cuadro sinóptico de la técnica





**Control de calidad**

Se realiza a posteriori examinando los blancos para asegurar que no hay contaminación.



# Muestreo de compuestos orgánicos en el fitoplancton/zooplancton de la zona fótica de la columna de agua (hasta el DCM)

<sup>1</sup>Morales, L.; <sup>1</sup>Caballero, G.; <sup>1,2</sup>González, B.; <sup>1</sup>Fernández-Pinos, M. C.;  
<sup>1</sup>Ojeda, M. J.; <sup>1</sup>Galbán-Malagón, C.; <sup>1</sup>Abad, E.; <sup>2</sup>Jiménez, B.; <sup>1</sup>Dachs, J.

<sup>1</sup>IDAEA (CSIC)

<sup>2</sup>IQOG (CSIC)

## Finalidad. Campo de aplicación

Los compuestos orgánicos semi-volátiles se encuentran en la fase disuelta y particulada, y de estas, al ser hidrofóbicos, se concentran al fitoplancton marino. Aquí se describe la metodología para el muestreo de muestras de plancton para su posterior análisis en contenido de contaminantes orgánicos persistentes.

## Conceptos generales

La metodología permite el muestreo de material particulado (fitoplancton, partículas grandes, algo de zooplancton) en cantidades suficientes para el análisis de contaminantes orgánicos.

## Equipamiento necesario

- Recipiente de vidrio (0.5 l o 1 l) previamente acondicionado. En origen será muflado. En el barco se lavará con acetona, posteriormente con abundante agua de mar del continuo.
- Redes de 60 cm de diámetro y 50 o 100 µm de luz de malla. Puede ser una red simple o doble (tipo bongo).
- Peso de 20 kg.

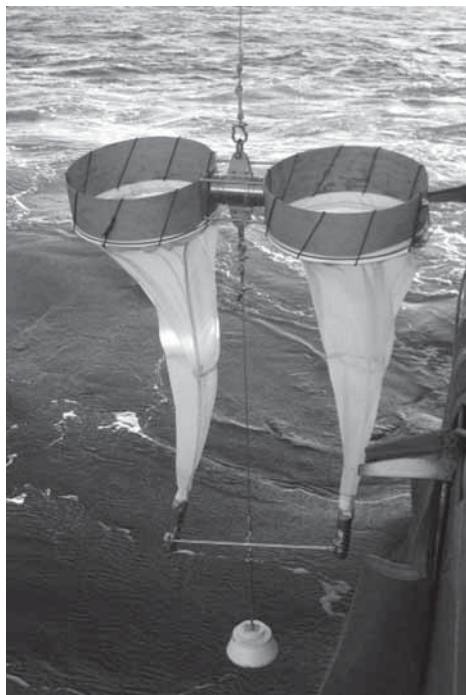


Figura 1. Sistema de redes para el muestreo de compuestos orgánicos en el fitoplancton de la zona fótica de la columna de agua.

### Reactivos u otro material fungible

- Filtros GFD de 4.7 cm, previamente acondicionados. Los filtros se muflan a 450 °C en el laboratorio durante 24 horas. Posteriormente se envuelven en papel de aluminio. Se taran y se guardan los filtros envueltos y dentro de una bolsa zip de forma individual.
- Pinzas de acero inoxidable.
- Acetona de alta pureza.
- Pipetas Pasteur previamente mufladas y guardadas en papel de aluminio y bolsas zip.
- Papel de aluminio.
- Bolsas ZIP pequeñas.

### Calibración

Se apuntará en el estadillo la profundidad de los lances y el número de lances realizados. Para cada filtro GFF se determina el volumen de agua filtrado y la fracción que representa respecto al total.

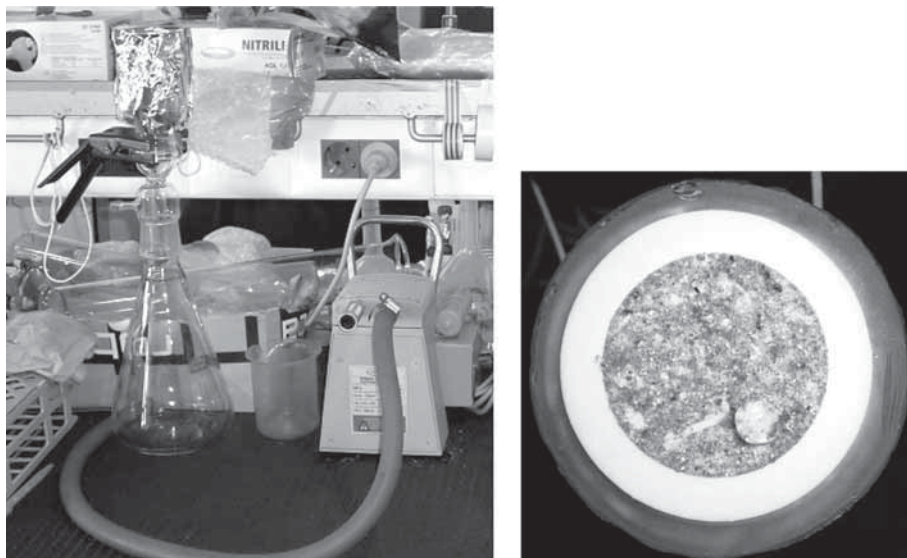


Figura 2. Izquierda: sistema de filtrado formado por kitasatos y bomba de vacío. Derecha: filtro con muestra recogida siguiendo este protocolo.

## Descripción de la técnica

### *Lavado del material*

- El cubilete de la red se limpia antes de la pesca con acetona y después con abundante agua de mar.
- El recipiente de vidrio se limpia con el mismo proceso.

### *Pesca vertical*

1. Se limpia la red y el cubilete con agua de mar.
2. Se hacen tantos lances como sea posible hasta debajo del DCM (a DCM+ 20 m o según indique el CTD). Los lances se hacen bajando la red a 30-40 m/min y subiendo la red a 20 m/min. Cuando las condiciones de la mar no son buenas, se sube a velocidades más lentas.
3. En cada lance, se vierte el agua del cubilete en un recipiente de vidrio previamente muflado en el laboratorio.
4. Se etiqueta el recipiente y al final de los lances se lleva al laboratorio.
5. Se filtra la muestra de plancton con filtros GF/D previamente muflados y pesados. Cuando se colmata se usa otro filtro.
6. Se dobla el filtro con unas pinzas previamente lavadas con acetona y se guardan en una bolsa zip a -20 °C.
7. Se apunta toda la información sobre las pescas en el estadillo.

### Cuadro sinóptico de la técnica

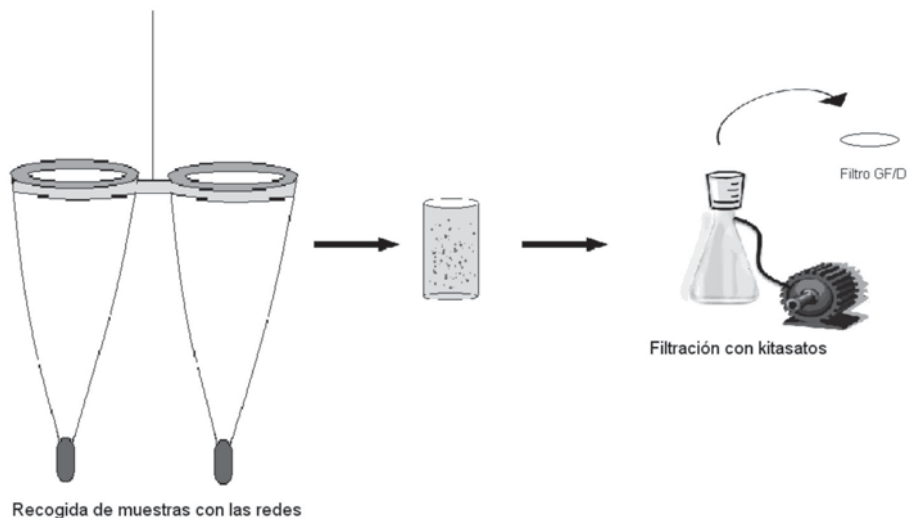


Figura 3. Esquema de la recogida de muestras.

### Cálculo de los resultados

El volumen de agua se calcula con el número de lances y la profundidad de muestreo.

### Control de calidad

Es necesario realizar los blancos de campo necesarios. Se guardarán filtros GF/D, sin contenido de muestra, para usar como blancos. También se muestrea agua de mar que ha pasado por el cubilete para determinar si la red/cubilete contamina la muestra.

## Muestreo de fitoplancton en la zona fótica (3 m, DCM y DCM + 40) para el estudio de la expresión génica influenciada por contaminantes orgánicos persistentes

Fernández-Pinos, M. C.; Casado, M.; Dachs, J.; Piña, B.

IDAEA (CSIC)

### Finalidad. Campo de aplicación

Muestreo del fitoplancton de la zona fótica comprendido entre 0.22  $\mu\text{m}$  y 25  $\mu\text{m}$  de diámetro. El objeto es recoger un volumen suficiente de agua en el menor tiempo posible (<10 min) para el estudio de la expresión génica de los organismos fotosintéticos marinos en relación con la concentración de los contaminantes orgánicos persistentes, analizada en la misma zona de muestreo.

### Conceptos generales

La metodología permite el muestreo de volúmenes de agua próximos a 1 l con el fin de tener suficientes células fitoplanctónicas para la posterior extracción de DNA y RNA y el estudio de la variación en la expresión génica de los genes *target*, ante diferentes concentraciones de contaminantes orgánicos persistentes.

El tiempo de muestreo ha de ser inferior a 10 min desde que se obtiene la muestra hasta que está fijada para que no haya cambios en la expresión génica debidos a un tiempo excesivo fuera del agua (Steglich et ál. 2010).

### Equipamiento necesario

- Botella de vidrio de 1 l.
- Probeta de 1 l.

- Kitasatos de 2 l.
- Bomba de vacío.
- Sistema de prefiltrado y malla de 25  $\mu\text{m}$  de poro.
- Micropipeta de 1000  $\mu\text{l}$ .
- Pinzas para filtros (sin estrías).
- Vidrio para cortar los filtros.
- *Cutter*.
- Gradilla para criotubos.
- Cronómetro.

### Reactivos u otro material fungible

- Filtro de membrana Omnipore de 47 mm de diámetro y 0.22  $\mu\text{m}$  de poro.
- Criotubos de 2 ml.
- Punta de micropipeta de 1000  $\mu\text{l}$  (punta azul).
- RNAlater.
- Lysis buffer (50 mM Tris-HCl, 40 mM EDTA, 0.75 M Sacarosa).

### Calibración

Ninguno de los aparatos utilizados requiere calibrado, con excepción del CTD de la roseta, que será ajustado por el equipo UTM del barco.

### Descripción de la técnica

1. Coger 1 l de agua de la botella Niskin (de la profundidad que corresponda, 3m, DCM o DCM+ 40) en una botella de vidrio.
2. Filtrar inmediatamente (el sistema de filtrado debe estar previamente montado y limpio). El agua se mide en la probeta y se va echando poco a poco en el sistema de filtrado. Máximo 10 minutos.
3. Cuando se acaba de filtrar, coger el filtro con las pinzas, ponerlo en el vidrio para cortar filtros y cortarlo en dos mitades iguales, utilizando un *cutter* limpio.
4. Una mitad se pone en el criotubo en el que previamente hemos puesto 1 ml de RNAlater y la otra mitad en el criotubo en el que previamente hemos puesto 1 ml de Lysis Buffer (el filtro debe quedar totalmente cubierto por el conservante, ya sea Lysis buffer o RNAlater).
5. Guardar el criotubo que contiene el la mitad del filtro con RNAlater (será utilizado para la extracción de RNA) en el congelador de -80 °C y el que contiene la mitad del filtro con Lysis buffer (será utilizado para la extracción de DNA) en el congelador a -20 °C.



## Cuadro sinóptico de la técnica



Figura 1. Esquema del sistema de muestreo de fitoplancton en la zona fótica.

## Cálculo de los resultados

Una vez en el laboratorio se procederá a la extracción del DNA y RNA. La cuantificación de los genes expresados se realizará mediante la técnica de PCR a tiempo real.

## Control de calidad

Se realiza la extracción de DNA y RNA de cada una de las muestras por separado, para que el DNA sirva como control en la cuantificación de los genes expresados en la muestra de RNA, dado que en la muestra de DNA se encontrarán todos los genes, tanto los que se expresan como los que no.

## Referencias

- STEGLICH, C., D. LINDELL, M. FUTSCHIK, T. RECTOR, R. STEEN, S.W. CHISHOLM. 2010. «Short RNA half-lives in the slow-growing marine cyanobacterium *Prochlorococcus*». *Gen. Biol.* 11: R54.



# Muestreo de plancton en la vertical de la zona fótica (hasta DCM + 20) para el estudio de la expresión génica influenciada por contaminantes orgánicos persistentes

Fernández-Pinos, M. C.; Casado, M.; Dachs, J.; Piña, B.

IDAEA (CSIC)

## Finalidad. Campo de aplicación

Muestreo del plancton de la zona fótica, de tamaño mayor de 50 µm de diámetro. El objeto es recoger una muestra de plancton representativa de la columna de la zona fótica para el estudio de la expresión génica de los organismos que viven en ella en relación con la concentración de los contaminantes orgánicos persistentes, analizada en la misma zona de muestreo.

## Conceptos generales

La metodología permite el muestreo de la comunidad planctónica para la posterior extracción de DNA y RNA y el estudio de la variación en la expresión génica de los genes *target*, ante diferentes concentraciones de contaminantes orgánicos persistentes.

## Equipamiento necesario

- Recipiente de vidrio.
- Pipeta Pasteur.
- Microcentrífuga.

## Reactivos u otro material fungible

- Tubos de centrífuga.
- Punta de micropipeta de 1000 µl (punta azul).
- RNAlater.

## Calibración

Se apuntará en el estadillo la profundidad de los lances y el número de lances realizados. Para cada muestra se determina el volumen de agua filtrado y la fracción que representa respecto al total.

## Descripción de la técnica

1. Agitar el agua de la pesca para resuspender los organismos decantados.
2. Pipetear 1 ml de agua de la pesca usando una pipeta de Pasteur larga para llenar dos eppendorfs hasta la línea de 0.5 ml.
3. Centrifugar a 12 000 rpm durante 5 minutos.
4. Eliminar el sobrenadante (volcando cuidadosamente el eppendorf)
5. Añadir 1.5 ml de RNAlater a cada eppendorf. Agitar vigorosamente y golpear con el dedo hasta resuspender el pellet.
6. Guardar los dos eppendorfs en el congelador de -80 °C.

## Cuadro sinóptico de la técnica

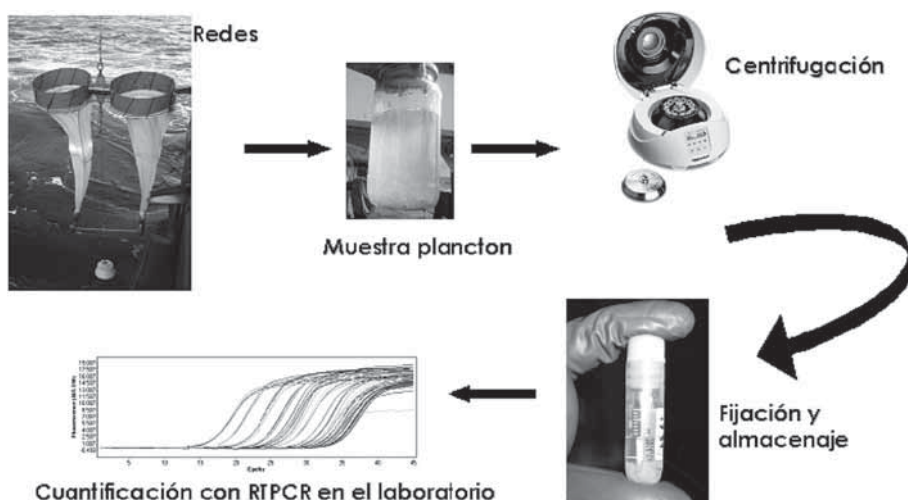


Figura 1. Esquema del sistema de muestreo de plancton en la vertical de la zona fótica.

### **Cálculo de los resultados.**

Una vez en el laboratorio se procederá a la extracción del DNA y RNA. La cuantificación de los genes expresados se realizará mediante la técnica de PCR a tiempo real.

### **Control de calidad**

Se realiza la extracción de DNA y RNA de cada una de las muestras por separado, para que el DNA sirva como control en la cuantificación de los genes expresados en la muestra de RNA, dado que en la muestra de DNA se encontrarán todos los genes, tanto los que se expresan como los que no.





# ÓPTICA, FITOPLANCTON Y METABOLISMO DEL OCÉANO

---





# Espectros de absorción de la luz por el material disuelto

<sup>1,2</sup>Agustí, S.; <sup>1</sup>Gutierrez, R.

<sup>1</sup>*Instituto Mediterráneo de Estudios Avanzados (UIB-CSIC)*

<sup>2</sup>*The UWA Oceans Institute and School of Plant Biology  
University of Western Australia*

## Finalidad. Campo de aplicación

Realización de medidas de la absorción de la luz por el material disuelto en el agua de mar.

## Conceptos generales

La fracción ópticamente activa de la materia orgánica disuelta se denomina Materia Orgánica Disuelta Coloreada (CDOM por sus siglas en inglés) y absorbe la luz de forma característica, siendo la absorción mayor en la banda del ultravioleta (UV) y descendiendo exponencialmente al aumentar la longitud de onda. La materia orgánica coloreada disuelta es el componente más importante en absorber la radiación ultravioleta submarina en el océano. Como consecuencia del proceso de absorción de la radiación solar especialmente en la banda del UV, la CDOM es disociada en formas moleculares más pequeñas, lo que la hace más transparente, y a su vez lábil y accesible a las bacterias (e.g. Kieber et ál. 1989). Es excretada por el fitoplancton, o transportada por distintos procesos desde fuentes externas hasta el océano, su foto-reactividad influye en su uso por los microorganismos, por lo que su dinámica y concentración en el océano tienen una gran importancia en las propiedades ópticas del agua y en los ciclos del carbono y otros elementos.

## Equipamiento necesario

- Espectrofotómetro de doble haz, UV-Visible.
- Lámpara de radiación UVC.

## Reactivos u otro material fungible

- Botes de polipropileno 100 ml.
- Agua MilliQ.
- Vaso de precipitados.
- Pipetas Pasteur de alto volumen.
- Cubetas de cuarzo de 10 cm.
- Millex (filtros de jeringa) 0.2  $\mu\text{m}$ .
- Jeringas.
- Ácido Clorhídrico.
- Bote con tapadera.

## Descripción de la técnica

1. Se tomarán 100 ml de muestra en botes de polipropileno lavados en ácido. Se filtrará con filtros de jeringa de 0.2  $\mu\text{m}$  de poro.
2. *Lectura en espectrofotómetro*: la DO se medirá en intervalos de 1 nm entre 250 y 700 nm en un espectrofotómetro de doble haz, utilizando cubetas de cuarzo de 10 cm. Como blanco se utilizará agua Milli-Q irradiada con UV utilizando una lámpara de radiación UVB. Dado que la radiación UVB destruye el CDOM.
3. Los espectros se corregirán mediante sustracción de la lectura a 700 nm para eliminar posibles sesgos inducidos por problemas de dispersión interna (Bricaud et ál. 1981). La densidad óptica se transformará a medidas de coeficiente de absorción  $a\text{CDOM}_{(\lambda)}$  ( $\text{m}^{-1}$ ) aplicando la ecuación 1.

## Cálculo de los resultados

$$a\text{CDOM}_{(\lambda)} = \text{DO}(\lambda) \times 2.3 / l \quad (1)$$

donde  $\lambda$  es la longitud de onda, 2.3 es el factor para convertir el logaritmo en base 10 al logaritmo natural, y  $l$  es la longitud de la cubeta en metros.

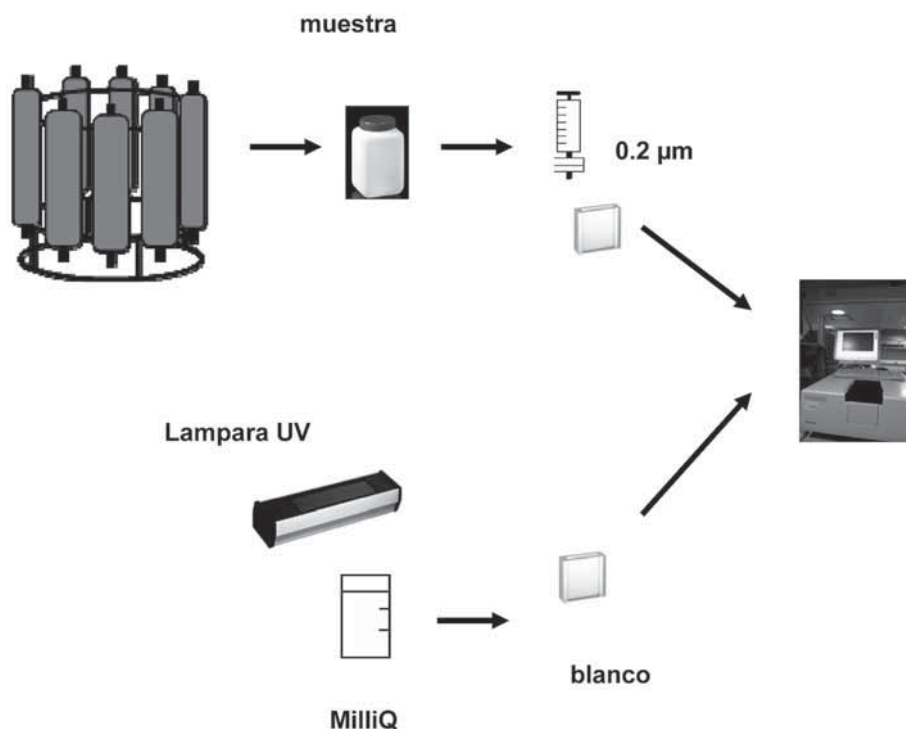
## Control de calidad

Se debe evitar la contaminación por materia orgánica, especialmente en el blanco. Su concentración en el océano más oligotrófico es muy baja, se espera que la señal se pueda perder en aguas muy oligotróficas.

## Limpieza

Todo el material debe estar escrupulosamente limpio, se puede utilizar un baño con HCL diluido 10 veces (al 3.7% ) donde dejaremos el material sumergido hasta previo uso. Lavar bien con agua destilada. Usar guantes.

## Cuadro sinóptico de la técnica



## Referencias

- BRICAUD, A., A. MOREL, L. PRIEUR. 1981. «Absorption by dissolved organic matter of the sea (yellow substance) in the UV and visible domains». *Limnol. Oceanogr.* 26: 43-53.
- KIEBER, D. J., J. MCDANIEL, K. MOPPER. 1989. «Photochemical source of biological substrates in seawater: implications for carbon cycling». *Nature*. 341: 637-639.



# Determinación de los espectros de absorción de la luz por las partículas

<sup>1,2</sup>Agustí, S.; <sup>1</sup>Gutiérrez, R.

<sup>1</sup>*Instituto Mediterráneo de Estudios Avanzados (UIB-CSIC)*

<sup>2</sup>*The UWA Oceans Institute and School of Plant Biology  
University of Western Australia*

## Finalidad. Campo de aplicación

El espectro de absorción de luz del fitoplancton es un parámetro importante dentro de los modelos bio-ópticos, especialmente aquellos relacionados con la interpretación del color del océano. También nos da información acerca de la estructura de la comunidad fitoplanctónica, la producción primaria y la penetración de luz en la capa superficial del océano.

## Conceptos generales

El cálculo del coeficiente de absorción de luz ( $a(\lambda)$ ) por las partículas juega un papel importante en la determinación de la variabilidad óptica de la columna de agua. Entre los principales contribuyentes a los procesos de absorción de luz en la columna de agua cabe destacar el papel del fitoplancton. Otros son la materia inorgánica particulada y la materia detritica. La contribución de cada uno de ellos a  $a(\lambda)$  varía dependiendo de la localización, las poblaciones fitoplanctónicas predominantes y las características de la masa de agua.

La técnica que se describe a continuación consiste en cuantificar la cantidad de luz que es absorbida por las partículas retenidas en un filtro de fibra de vidrio.

## Equipamiento necesario

- Espectrofotómetro de doble haz UV-Visible.

### *Equipo de filtración*

- Bomba eyela.
- Rampa de filtración.
- Pinzas de sujeción.
- Soporte y columna de filtración graduada.
- Tapón con tubo de succión.

### **Reactivos u otro material fungible**

- Filtros 25 mm Whatman GF/F.
- Agua de mar.
- Pinzas.
- Filtros millex 0.2.
- Jeringas.
- Placas petri 4 divisiones.
- Pipetas Pasteur.
- Papel de aluminio.
- Botes de muestreo.
- Probeta de plástico 1000 ml.
- Tubos eppendorf.
- Pegatinas pequeñas de etiquetado.
- Lápiz.
- Bolsas ciplop pequeñas.
- Ácido clorhídrico.
- Guantes.
- Material antideslizante.

### **Calibración**

La propia del espectrofotómetro.

### **Descripción de la técnica**

*Filtración:* se tomarán muestras de 250 ml a 3L (hasta observar color en el filtro), dependiendo de la masa de agua, que se concentrarán por filtración a baja presión (aprox. 100 mm Hg) en filtros de 25 mm Whatman GF/F.

Hay que tener en cuenta a la hora de filtrar que la muestra no se concentre toda en el mismo punto del filtro, sino que esté bien distribuida por la superficie de filtración.

Tras la filtración, el filtro se mantendrá húmedo (añadiendo unas gotas de agua de mar filtrada) y en oscuridad hasta la lectura, lo más inmediatamente posible, en el espectrofotómetro.

*Lectura en espectrofotómetro:* la densidad óptica (DO) de las partículas concentradas en el filtro se medirá en un espectrofotómetro de doble haz y con capacidad de medir en el visible y en el ultravioleta. Como blanco se utilizará un filtro Whatman GF/F limpio humedecido en el agua de mar filtrada. Para reducir la dispersión de la luz, el filtro se colocará lo más cerca posible de la entrada del haz de luz del espectrofotómetro con las partículas enfrentadas hacia el haz de luz entrante. El filtro se puede colocar en portas de cuarzo u otro material que sea transparente a la radiación ultravioleta.

A continuación se medirá la DO en intervalos de 1 nm entre 280 y 750 nm.

## Cálculo de los resultados

Las medidas de DO se transformarán a coeficientes de absorción de la luz por las partículas ( $a_p(\lambda)$ ,  $m^{-1}$ ) aplicando la ecuación 1:

$$a_p(\lambda) = 2.3 \text{ OD}_{f(\lambda)} C / V \beta_{(\lambda)} \quad (1)$$

donde  $\lambda$  es la longitud de onda (nm), 2.3 es el factor para convertir el logaritmo en base 10 al logaritmo natural,  $\text{OD}_{f(\lambda)}$  es la densidad óptica del filtro con las partículas, a cada longitud de onda,  $C$  es el área del filtrado ( $m^2$ ),  $V$  el volumen de agua filtrada ( $m^3$ ) y  $\beta$  es el factor de amplificación del paso de luz de los filtros calculado según Bricaud y Stramski (1990), siguiendo la ecuación:

$$\beta_{(\lambda)} = 1.63 \text{ OD}_{f(\lambda)}^{-0.22} \quad (2)$$

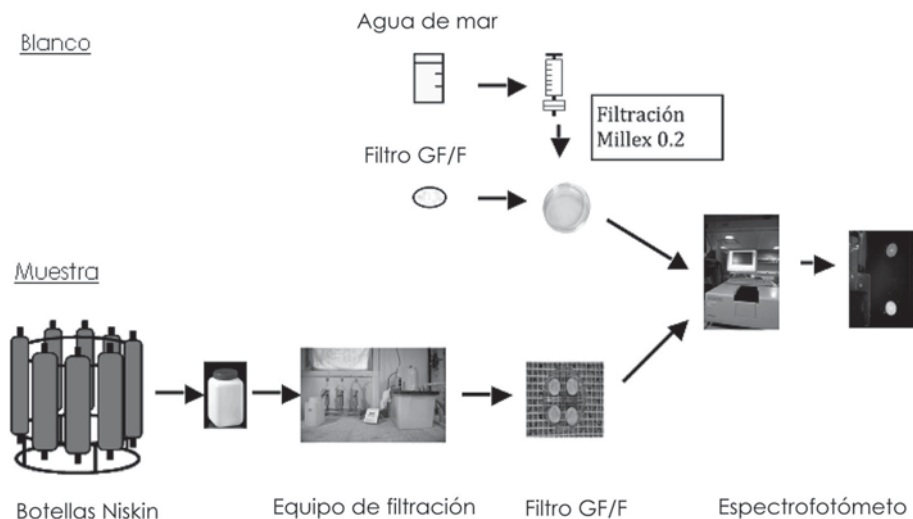
## Almacenamiento de la muestra

Si no es posible realizar la lectura en el espectrofotómetro tras la filtración, los filtros se pueden preservar sin doblar congelados, añadiendo unas gotas de formol para preservar los pigmentos.

## Limpieza

Todo el material debe estar escrupulosamente limpio, se puede utilizar un baño con HCL al 37% donde dejaremos el material inmerso hasta previo uso. Lavar bien con agua destilada.

## Cuadro sinóptico



## Referencias

BRICAUD, A., D. STRAMSKI. 1990. «Spectral absorption coefficients of living phytoplankton and non algal biogenous matter: A comparison between the Peru upwelling area and the Sargasso Sea». *Limnol. Oceanogr.* 35: 562-582.



# Determinación de la abundancia de nano y picofitoplancton mediante citometría de flujo

Lubián Chaichío, L. M.

*Instituto de Ciencias Marinas de Andalucía (CSIC)*

## Finalidad. Campo de aplicación

Análisis y cuantificación de la abundancia de poblaciones de nano y picofitoplancton mediante el uso de citometría de flujo.

## Conceptos generales

La citometría de flujo es una técnica diseñada para analizar las señales ópticas producidas al incidir sobre cada célula uno o más haces de luz láser a una determinada longitud de onda. La sucesión de células a través de los haces de luz se consigue mediante un sistema de fluidos en régimen laminar coaxial. Las señales son fundamentalmente de dos tipos: dispersión de la luz, indicadoras del tamaño y la estructura celulares, y la emisión de fluorescencia producida por los propios componentes celulares o de compuestos añadidos para caracterizar moléculas específicas de la célula.

## Equipamiento necesario

El *BIO Hespérides* está equipado para esta campaña al menos de un citómetro de flujo FACScalibur (Beckton-Dickinson) provisto de un láser de argón de 488 nm y un diodo rojo de 633 nm de longitudes de onda de excitación.

## Reactivos u otro material fungible

- Agua Milli-Q.
- Fijadores Paraformaldehído y/o Glutaraldehído.

### *Preparación de 1 L de P+G (paraformaldehído + glutaraldehído)*

- Pesar 100 g de paraformaldehído (Sigma P6148).
- Añadirlo a 880 ml de agua Milli-Q en un vaso de precipitados, cubierto con Parafilm (para reducir la evaporación del agua) que contenga una mosca magnética. El agua debe estar muy caliente, casi en ebullición.
- Dejarlo agitándose en una placa calefactora (90 °C) durante un mínimo de 24 h en una campana de gases. Después de que se disuelva completamente (puede durar 3 días), añadir 100 ml de PBS (solución tampón de fosfato). El PBS se prepara con 1 pastilla de Sigma P4417 disuelta en 200 ml de agua Milli-Q. Añadir 20 ml de glutaraldehído al 25%. Filtrar a través de un filtro de policarbonato de 0.2 µm. Hay que tener en cuenta que el aparato de filtración utilizado no podrá usarse ya para otra cosa.
- Distribuir en tubos de plástico (preferiblemente entre 5 y 20 ml). Congelar los tubos a -70 °C. Guardar los tubos a -20 °C. Una vez descongelados, los tubos deben conservarse a 4 °C y usarse en el plazo máximo de una semana.

De este cóctel se añade a la muestra en una proporción de 1:10.

## Calibración

Existen en el mercado numerosas esferas de calibración, tanto de tamaño de la partícula como de señales de fluorescencia para las diferentes longitudes de onda de excitación. Para la calibración de las señales de SSC y FSC (ver más adelante) se suelen utilizar cultivos puros de microalgas de diferente tamaño conocido. Los calibradores para las señales de fluorescencia solo sirven para comprobar el nivel y la adecuación de las fuentes de excitación y señales de emisión (fotomultiplicadores) del aparato. Hay que tener en cuenta que la citometría de flujo solo da medidas relativas de dispersión de luz y fluorescencia, en función de los *settings* utilizados.

## Descripción de la técnica

El volumen de muestra necesario para el análisis citométrico en cada profundidad de toma de muestra es de 1 a 3 ml, aunque por comodidad y

sobre todo si la muestra se filtra, se fija, o se añade algún fluorocromo se suele utilizar más volumen. En el caso de que haya mucho microfitoplancton u otro material particulado que pueda obturar la entrada de muestra en el aparato, se debe filtrar por malla de 20  $\mu\text{m}$  de poro.

Si el análisis de las muestras va a ser inmediato, conviene no fijarlas. No obstante, el tiempo de adquisición en cada análisis suele ser de varios minutos, por lo que el tiempo transcurrido desde el análisis de la primera profundidad hasta la última puede ser de más de una hora, con el consiguiente deterioro de las poblaciones más delicadas (flagelados). Lo más conveniente sería fijarlas con un buen fijador, como el que se utilizaría si fuéramos a conservar las muestras congeladas hasta su análisis posterior. Este fijador es 1% de paraformaldehído + 0.05% de glutaraldehído (modo de preparación descrito anteriormente).

Las señales ópticas que se miden en el citómetro son:

- **FSC** (dispersión frontal de la luz) que da información sobre el tamaño celular.
- **SSC** (dispersión lateral de la luz) que da información sobre el tamaño y la estructura celulares.
- **FL1** (fluorescencia en el intervalo de  $530\pm 15$  nm de longitudes de onda). Esta señal se utiliza para analizar señales fluorescentes procedentes de fluorocromos añadidos para marcar las células, ya que estas no poseen compuestos fluorescentes a estas longitudes de onda.
- **FL2** (fluorescencia en el intervalo de  $585\pm 20$  nm de longitudes de onda), que en células del fitoplancton va a corresponder a la fluorescencia debida a la ficoeritrina.
- **FL3** (fluorescencia a  $\geq 635$  nm de longitud de onda), que corresponde a la fluorescencia debida a la clorofila
- **FL4** (fluorescencia en el intervalo de  $669\pm 16$  nm de longitudes de onda), que corresponde a la fluorescencia debida a la ficocianina, si bien hay que tener en cuenta que interfiere la fluorescencia de la clorofila.

La señal de FSC se mide con un fotodiodo y el resto con fotomultiplicadores, por lo que las intensidades de las señales pueden ser modificadas a voluntad por el citometrista. Las señales analógicas son finalmente transformadas en digitales y procesadas con un programa informático adecuado, que en el caso del citómetro FACScalibur es el programa "Cell Quest". El flujo a utilizar es el indicado como "high" en el caso del análisis de nanofitoplancton y "medium" o "low" en el caso de analizar picofitoplancton. La estimación de la abundancia se puede hacer mediante la determinación del número de eventos adquiridos en un tiempo, si conocemos el flujo con el que se realiza el análisis. El flujo se puede calcular en cada caso por la pérdida de pesada o de volumen de una muestra de agua de volumen conocido, después de pasarla durante un tiempo determinado (por ejemplo 2

minutos). La abundancia también se puede estimar mediante la adición a la muestra de un volumen conocido de una suspensión de esferas de calibración, cuya concentración se ha determinado previamente. Por el número de eventos adquiridos correspondientes a estas esferas, en cualquier tiempo de adquisición, podremos saber el volumen analizado y calcular la densidad de las distintas poblaciones analizadas en esa muestra.

Los *settings* a utilizar dependen del intervalo de tamaños de las poblaciones que queremos analizar. No hay un solo *setting* que sea capaz de analizar pico y nanofitoplancton a la vez. Normalmente se utilizan dos *settings*, pero también hay que tener en cuenta la potencia del láser en ese momento y la sensibilidad de los fotomultiplicadores en cada aparato. Durante la campaña Malaspina hemos utilizado estos *settings*:

	Nanofitoplancton	Picofitoplancton
FSC	E01	E00
SSC	270	420
FL1	660	540
FL2	450	660
FL3	270	612
FL4	300	705
Threshold	52 (FL3)	52 (FL3)

El tiempo de adquisición puede variar dependiendo de la concentración de células entre 1 y 10 minutos. El número de células analizadas estará comprendido entre 1000 y 20 000.

### Cálculo de los resultados

Mientras hacemos la adquisición podemos ir viendo los resultados de los citogramas, en las plantillas que hayamos seleccionado. Una vez obtenidos los citogramas, debemos identificar las distintas poblaciones y marcarlas. Los distintos parámetros estadísticos se obtienen en la opción “Stats” y se pueden exportar (“File – Export Statistics”) y pasarlo a un archivo excel.

Sabiendo el número de eventos registrados para cada población, el tiempo de adquisición de muestra y el flujo utilizado, se calcula la densidad de células existentes en cada caso.

## Control de calidad

El nivel de precisión y fiabilidad de los resultados va a depender en gran medida de la experiencia del citometrista. Algunas poblaciones del nano y picofitoplancton como criptofíceas y cianobacterias se pueden distinguir claramente por la presencia de determinados pigmentos como ficoeritrina y ficocianina, y por su tamaño. En otros casos pueden aparecer poblaciones del nanofitoplancton que se solapan entre sí y es más difícil discriminarlas. Es conveniente analizar en el mismo citómetro varias especies conocidas del nano y picofitoplancton procedentes de cultivos y nos pueden servir de patrones, en particular del tamaño de las poblaciones analizadas procedentes de muestras naturales. Las especies de referencia pueden ser las siguientes: *Synechococcus* sp., *Nannochlororis oculata*, *Nannochloropsis gaditana*, *Isochrysis galbana*, *Chaetoceros gracilis*, *Rhodomonas salina*, *Tetraselmis suecica* y *Gyrodinium* sp.

## Referencias

- COLLIER, J. L. 2000. «Flow cytometry and the single cell in phycology». *Journal of Phycology*, 36 (4): 628-644.
- MARIE, D., N. SIMON, D. VAULOT. 2005. «Phytoplankton cell counting by flow cytometry». En R. Andersen (ed.), *Algal culturing techniques*, vol. 27, Burlington (Mass.), Academic Press, pp. 253-267.
- RODRÍGUEZ, J., J. M. BLANCO, F. JIMÉNEZ-GÓMEZ, F. ECHEVARRÍA, J. GIL, V. RODRÍGUEZ, J. RUIZ, B. BAUTISTA, F. GUERRERO. 1998. «Patterns in the size structure of the phytoplankton community in the deep fluorescence maximum of the Alboran Sea (southwestern Mediterranean)». *Deep-Sea Research* I 45: 1577-1593.



# Toma de muestras de fitoplancton mayor de 20 $\mu\text{m}$ para análisis de imagen

Moreno-Ostos, E.; Blanco Martín, J. M.; Reul, A.;  
Palomino-Torres, R. L.; Rodríguez, V.; Rodríguez, J.

*Universidad de Málaga*

## Finalidad. Campo de aplicación

Toma de muestras sobre las que posteriormente se llevarán a cabo análisis de imagen que permita extender la información adquirida mediante citometría de flujo y modelar el espectro de tamaños del fitoplancton completo.

## Conceptos generales

La representación macroscópica del plancton implícita en las distribuciones de abundancia de los diferentes tamaños de organismos se revela como una herramienta importante en el estudio de la estructura y del comportamiento dinámico del ecosistema pelágico, en el que el medio fluido, los organismos vivos y las partículas no vivas se acoplan a diferentes escalas. Debido a la relevancia de las relaciones entre tasas fisiológicas y tamaño individual, el enfoque se asienta sobre bases sólidas de carácter termodinámico y evolutivo. El estudio de la estructura de tamaños del plancton sirve de escenario para el análisis de conceptos, teorías y observaciones que entremezclan ecología, biología evolutiva, teoría de la información y termodinámica en busca de una única, sencilla y profunda (aunque elusiva) explicación de la diversidad y complejidad de los sistemas naturales. Al mismo tiempo, la aplicación del enfoque empírico lo muestra como una herramienta excelente en el estudio de los ecosistemas pelágicos y comunidades planctónicas a través del acoplamiento entre Física y Biología a diferentes escalas. La elaboración de los espectros de tamaño re-

quiere extender la información de abundancia-tamaño recabada mediante citometría de flujo (rango aproximado 1-15 micras) a grupos de microalgas de mayor tamaño (rango de células mayores de 15 micras) utilizando para ello procedimientos de análisis de imagen.

### Equipamiento necesario

- Dispositivo de filtración.

### Reactivos u otro material fungible

- Frascos de vidrio color topacio de 125 ml de volumen.
- Mallas de 20  $\mu\text{m}$  de tamaño de poro.
- Lugol acético.

### Descripción de la técnica

● **Origen del material biológico:** la profundidad de toma de las muestras corresponderá, en términos generales, a superficie, DCM y una profundidad intermedia entre ambas. La elección de profundidades debe hacerse de forma congruente con el resto de variables fitoplanctónicas analizadas, tales como pigmentos, viabilidad celular, metabolismo y producción primaria.

● **Tamaño de la muestra:** para garantizar la presencia en cantidades fiables de células grandes el volumen de muestra debe ser de 4 litros.

● **Proceso de la muestra a bordo:**

Una vez tomadas las muestras se procederá a su filtración a través de mallas de 20 micras de diámetro de poro. El material retenido en el filtro se lavará con agua de mar filtrada sobre un frasco de cristal color topacio de 125 ml de volumen. Seguidamente se fijará el material obtenido utilizando para ello 2 ml de lugol acético.

● **Etiquetado de la muestra:**

Una vez fijada la muestra deberá ser convenientemente etiquetada. La etiqueta deberá presentar la siguiente información:

Fecha (dd.mm.aaaa)  
Leg  
Estación (número y coordenadas)  
Profundidad

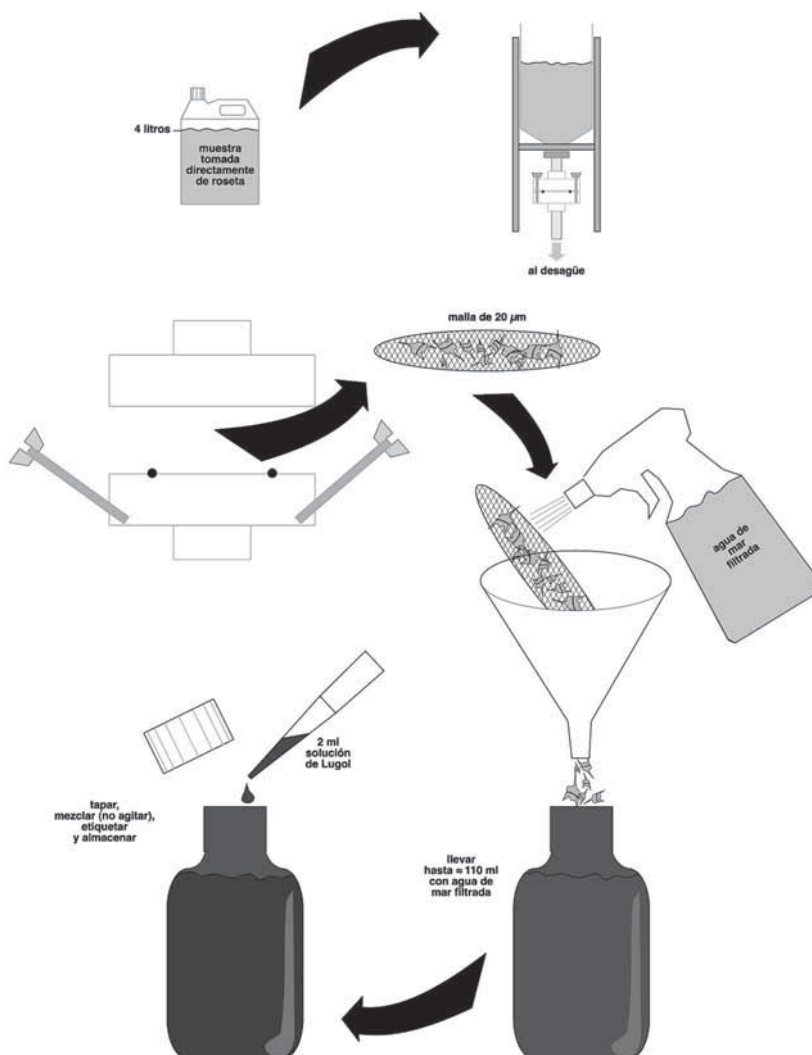
● **Proceso en el laboratorio:** una vez en el laboratorio de Análisis de Imagen de la Universidad de Málaga, se procederá al recuento y medida de las distintas células utilizando para ello un microscopio invertido Leica dotado de una cámara digital AVT Pike 145C y un sistema informático de



alto rendimiento provisto de *software* específico para análisis de imagen semiautomático interactivo con el usuario, que debe reconocer los grupos y características celulares.

- **Final:** la tarea se completará con el acoplamiento de los datos de citometría de flujo y de análisis de imagen para modelar el espectro de abundancia/tamaño para la comunidad de fotoautótrofos (Rodríguez et ál. 1998; Rodríguez et ál. 2001).

### Cuadro sinóptico de la técnica



## Referencias

- RODRÍGUEZ, J., J. M<sup>a</sup> BLANCO, F. JIMÉNEZ-GÓMEZ, F. ECHEVARRÍA, J. GIL, V. RODRÍGUEZ, J. RUIZ, B. BAUTISTA, F. GUERRERO. 1998. «Patterns in the size structure of the phytoplankton community in the deep fluorescence maximum of the Alborán Sea (Southwestern Mediterranean)». *Deep Sea Res.* 45: 1577-1593.
- RODRÍGUEZ, J., J. TINTORÉ, J. T. ALLEN, J. M<sup>a</sup> BLANCO, D. GOMIS, A. REUL, J. RUIZ, V. RODRÍGUEZ, F. ECHEVARRÍA & F. JIMÉNEZ-GÓMEZ. 2001. «Mesoscale vertical motion and the size structure of phytoplankton in the ocean». *Nature* 410: 360-363.

# Cuantificación de la abundancia de células vivas y muertas de las comunidades de picoplancton

<sup>1,2</sup>Agustí, S.

<sup>1</sup>*Instituto Mediterráneo de Estudios Avanzados (UIB-CSIC)*

<sup>2</sup>*The UWA Oceans Institute and School of Plant Biology  
University of Western Australia*

## Finalidad. Campo de aplicación

Determinación de la abundancia de células vivas y muertas de las comunidades picoplanctónicas del océano.

## Conceptos generales

Cuantificar la abundancia de células vivas y muertas del fitoplancton in situ es importante para conocer el papel de la mortalidad celular como proceso de pérdidas de las poblaciones naturales. Además, analizar el porcentaje de células vivas en las poblaciones naturales de picoplancton, ha demostrado ser una herramienta útil para identificar las relaciones de competencia o coexistencia del picofitoplancton in situ (Agustí, 2004) ya que permite identificar el grado de éxito en la supervivencia de las distintas poblaciones de la comunidad de picofitoplancton en relación a las condiciones naturales de luz (Agustí, 2004), niveles nutritivos y temperatura (Agustí y Sánchez 2002, Alonso-Laita et ál. 2005, Alonso-Laita y Agustí 2006, Lasternas et ál. En Prensa), e identificar la segregación de nichos o la competencia por los recursos in situ, lo que hasta ahora no había sido posible.

En las campañas Malaspina la abundancia de células vivas en las poblaciones de picofitoplancton se analizará aplicando el método de la digestión celular (CDA = Cell Digestion Assay) que es un test de la permeabilidad de la membrana de las células (Darzynkiewicz et ál. 1994).

La pérdida en la capacidad de mantener la homeostasis, que resulta en un aumento en la permeabilidad de la membrana celular, caracteriza a las células muertas, incluyendo tanto a las células que mueren por procesos necróticos como por apoptosis (ej. Wyllie et ál. 1980; Ellis et ál. 1991; Darzynkiewicz et ál. 1994).

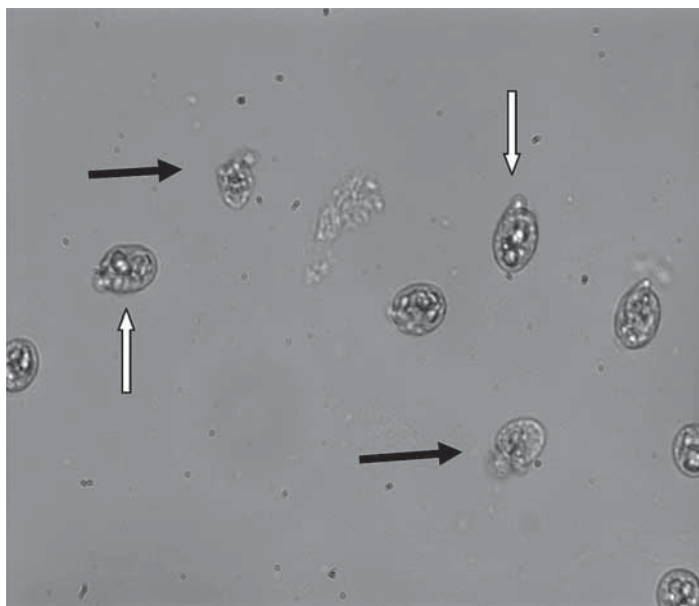


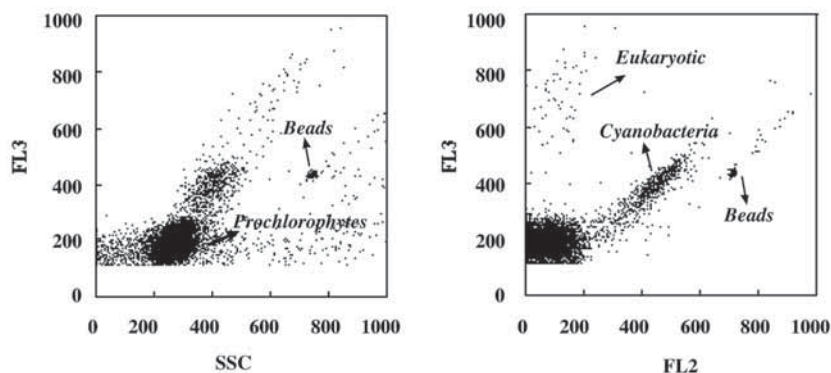
Figura 1. Cultivo de *Amphidinium carterae* al que se le ha aplicado el método CDA (Cell Digestion Assay) para identificar y cuantificar la abundancia de células vivas. Las flechas negras señalan células muertas que están siendo digeridas por las enzimas. Las flechas blancas señalan células vivas intactas.

El CDA fue adaptado para su aplicación a comunidades de fitoplancton por Agustí y Sánchez (2002) y consiste en la adición de una serie de enzimas digestivas (DNasa + tripsina) a las muestras, de forma que las células muertas con una mayor permeabilidad de la membrana no pueden evitar que las enzimas entren en la célula. Las enzimas, una vez dentro de la célula, la digieren y eliminan (Figura 1). Tras la incubación con DNasa + tripsina las células que restan en la muestra son solamente las células vivas, que poseían membranas íntegras.

Además, tras el CDA las células vivas permanecen intactas, de forma que mantienen sus propiedades morfológicas, ópticas y su fluorescencia natural, siendo fáciles de identificar utilizando un clitómetro de flujo (figura 2). La ventaja del CDA es que al no utilizar tinciones, las señales de fluo-

rescencia roja (FL3), naranja (FL2) o verde (FL1) de las células vivas permanecen similares a las de las poblaciones sin tratar, resultando inequívoca su identificación y cuantificación.

### Blank sample



### Cell digestion assay

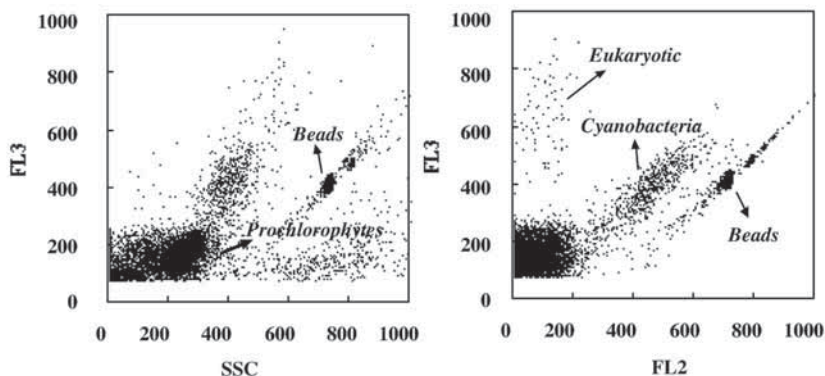


Figura 2. Scatter Plot del Citómetro FACSCalibur de los blancos y las muestras tras aplicar el CDA, en una muestra del Atlántico Tropical mostrando las señales de las poblaciones de *Synechococcus*, *Prochlorococcus* y de pico-Eucariotas.

### Equipamiento necesario

- Citómetro de flujo.
- Baño seco.
- Vórtex.

## Reactivos u otro material fungible

- Soluciones *stock*: solución DNAsa I, 400 µg de DNAsa / ml en HBSS (0.0004 g por cada ml HBSS). Solución de tripsina, 1% de tripsina en HBSS (0.01 g por cada ml HBSS).
- Tubos Falcon.
- Pipeta automática 100-1000 µl.
- Pipeta automática 10-100 µl.
- Solución de *Beads* fluorescentes -1 µm diámetro (capítulo citometría).
- Hielo picado.

## Calibración

Calibración de citometría de flujo como quedó registrada en la ficha *Determinación de la abundancia de nano y picofitoplancton mediante citometría de flujo*.

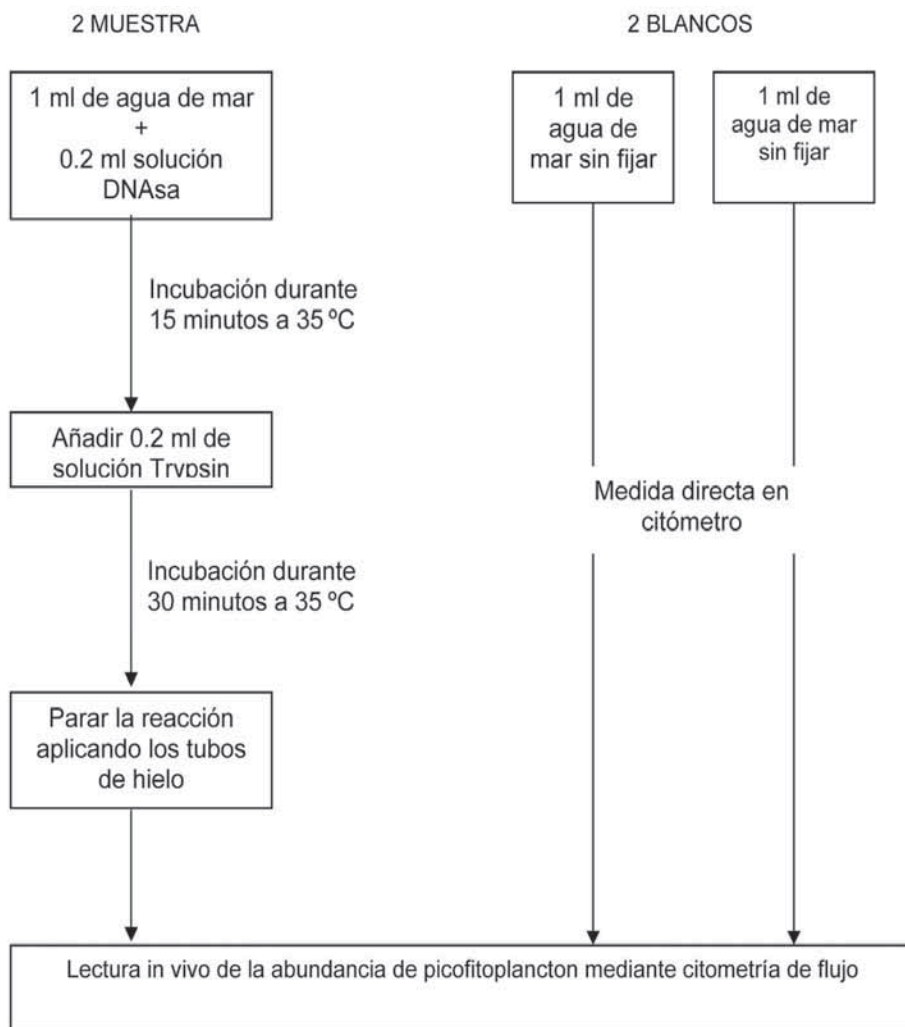
## Descripción de la técnica

Tras efectuar el muestreo, incubar por replicado 1 ml de agua de mar en tubos Falcon de cada profundidad con 0.2 ml de solución DNAsa a 35 °C durante 15 minutos, pasados los 15 minutos añadir 0.2 ml de solución de tripsina e incubar durante 30 minutos más a 35 °C. Pasado este tiempo, agitar en un vórtex y colocar los tubos en hielo para parar la reacción (este procedimiento no es necesario si las muestras se pasan al citómetro inmediatamente). Leer las muestras en vivo en el citómetro de flujo. Añadir a las muestras la solución de *Beads* calibrada para cuantificar las células. Paralelamente, 2 blancos de 1 ml de muestra en fresco (sin fijar) de cada profundidad se analizan en el citómetro de flujo. Las células de los blancos representan el total de la población (células muertas+vivas), mientras que las células tras el ensayo de la digestión enzimática representan las células vivas.

Temperatura de incubación: uso estándar: 35 °C. Especies polares o de aguas frías (menos de 10 °C): 25 °C (Llabrés y Agustí, 2008).

Las soluciones de enzimas después de preparadas deben filtrarse por 0.2 µm, distribuirse en alícuotas de pequeño volumen (ej. 2-5 ml) y guardar congeladas a -20 o -25 °C hasta su uso.

### Cuadro sinóptico de la técnica



### Cálculo de los resultados

La abundancia celular obtenida en los blancos (promedio) representa el total de la población (células muertas+vivas), mientras que las células tras el ensayo de la digestión enzimática representan las células vivas. La abundancia de células muertas se obtiene restando a la abundancia total la abundancia de células vivas.

## Control de calidad

- En aguas cuya temperatura sea menor de 10 °C la temperatura de incubación debe reducirse a 25 °C (Llabrés y Agustí, 2008). Si se recorren aguas de temperaturas menores de 15 °C, convendría hacer un test de fiabilidad incubando paralelamente muestras a 35 y a 25 °C para comprobar que la precisión y fiabilidad de los resultados no están alteradas por la temperatura de incubación.
- Dejar a temperatura ambiente unos minutos, tanto las muestras que acaban de incubar a 35 °C, como las que han estado en hielo para detener las reacciones enzimáticas. Este procedimiento conviene antes de leerlas en el citómetro de flujo para no alterar la viscosidad de la muestra que puede alterar un poco la velocidad del flujo, y también para evitar en poblaciones de *Prochlorococcus* que su señal de SSC (*Side Scattering*) pueda variar si las muestras están frías (baño de hielo).
- Un test de calidad para comprobar la eficiencia de los reactivos se realizará periódicamente a bordo, y siempre que se encuentre algún resultado irregular, comparando los resultados del CDA con los obtenidos aplicando un método independiente de cuantificación de células vivas. El test se realizará utilizando la tinción vital Back-light Kit (*Molecular Probes*) siguiendo el protocolo descrito en Llabrés y Agustí (2008). El test se realizará a bordo en el microscopio de epifluorescencia en poblaciones de *Synechococcus* ya que los picoeucariotas pueden ser poco abundantes impidiendo la obtención de resultados estadísticamente fiables.

## Referencias

- AGUSTÍ, S., C. M. SÁNCHEZ. 2002. «Cell viability in natural phytoplankton communities quantified by a membrane permeability probe». *Limnol Oceanogr* 47: 818-828.
- AGUSTÍ, S. 2004. «Viability and niche segregation of *Prochlorococcus* and *Synechococcus* cells across the central Atlantic Ocean». *Aquat. Microb. Ecol.* 36: 53-59.
- ALONSO-LAITA, P., N. NAVARRO, C. M. DUARTE, S. AGUSTÍ. 2005. «Seasonality of pico-phytoplankton abundance and cell death in a Mediterranean bay (Bay of Palma, Majorca Island)». *Vie et Milieu* 55: 177-184. Pico-phytoplankton Special Issue.
- ALONSO-LAITA, P., S. AGUSTÍ. 2006. «Contrasting patterns of phytoplankton viability in the subtropical NE Atlantic Ocean». *Aquat. Microb. Ecol.* 43: 67-78.
- DARZYNKIEWICZ, Z., X. LI, J. GONG. 1994. «Assays of cell viability: Discrimination of cells dying by apoptosis». En: DARZYNKIEWICZ Z., ROBINSON J. P.,



- CRISMAN H. A. (eds.), *Methods in cell biology*. Academic Press, San Diego, pp. 5-38.
- ELLIS, R. E., J. YUAN, H. R. HORVITZ. 1991. «Mechanisms and functions of cell death». *Ann. Rev. Cell Biol.*, 7: 663-698.
- LASTERNAS, S., S. AGUSTÍ, C. M. DUARTE. 2010. «Phyto- and bacterioplankton abundance and viability and their relationship with phosphorus across the Mediterranean Sea». *Aquat. Microb. Ecol.*, 60: 175-191.
- LLABRÉS, M., S. AGUSTÍ. 2008. «Extending the Cell Digestion Assay to Quantify Dead Phytoplankton Cells in Cold and Polar Waters». *Limnol. Oceanogr: Meth.* 6: 659-666.
- WYLLIE, A. H., J. F. R. KERR, A. R. CURRIE. 1980. «Cell death: the significance of apoptosis». *Internat. Rev. Cytol.* 68: 251-306.



# Determinación fluorimétrica de la concentración de clorofila *a*

Estrada, M.

*Institut de Ciències del Mar (CSIC)*

## Finalidad. Campo de aplicación

Determinación fluorimétrica de la concentración de clorofila *a* (Clor *a*) en un extracto acetónico.

Este método (Yentsch y Menzel, 1963) permite obtener estimaciones de la concentración de clorofila con pequeñas cantidades de muestra y es apto para el procesado de un número importante de muestras. El método permite detectar concentraciones de clorofila *a* del orden de  $0.01 \text{ mg m}^{-3}$ .

## Conceptos generales

La concentración de Clor *a* permite estimar la cantidad de biomasa fitoplanctónica en una muestra de agua. El método se basa en que la Clor *a* (y otros pigmentos algales) emiten fluorescencia en longitudes de onda rojas cuando son excitadas por luz azul. En diversas aplicaciones del método, la relación entre la magnitud de la fluorescencia antes y después de acidificar el extracto acetónico ( $R_b/R_a$ ) se utiliza para calcular la concentración de feopigmentos. La acidificación convierte en feopigmento toda la clorofila presente en la muestra y el cálculo de las concentraciones de clorofila y feopigmentos se basa en las diferencias de intensidad relativa de la fluorescencia de la Clor *a* pura y de los feopigmentos. Sin embargo, no se recomienda la aplicación general de fórmulas basadas en el método de acidificación porque puede haber interferencias de otros pigmentos (por ejemplo, clorofila *b*) que falseen los resultados. De todos modos, en este

protocolo se conserva el paso de acidificación de la muestra porque el índice Rb/Ra proporciona cierta información sobre las propiedades del extracto y porque puede servir para hacer comparaciones con estudios que sí lo hayan utilizado. El presente método no incluye trituración del filtro ni centrifugación del extracto, operaciones que permiten un ligero incremento de la eficiencia de extracción de clorofila, pero al precio de un importante aumento del tiempo de manipulación de cada muestra.

Para la determinación de Clor *a* total se utilizarán filtros de fibra de vidrio de 25 mm de diámetro (Whatman GF/F). Adicionalmente, las determinaciones de clorofila que correspondan a las profundidades de producción primaria se realizarán también utilizando filtros de policarbonato de 20, 2 y 0.2  $\mu\text{m}$  de tamaño de poro y 47 mm de diámetro (según la fracción de tamaño considerada), del mismo tipo de los utilizados para producción.

### Equipamiento necesario

- Rampa de filtración secuencial.
- Dosificador para acetona 90%.
- Fluorómetro Turner Designs, equipado con portacubetas para muestras individuales.

### Reactivos u otro material fungible

- Frascos de plástico para muestreo.
- Filtros.
- Tubos de centrifuga de 15 ml para extracción.
- Acetona 90%.
- Estándar de clorofila de *Anacystis nidulans* (Sigma Chemical Company).
- Ácido Clorhídrico 10%.
- Tubos de vidrio para lectura de la fluorescencia en el fluorómetro Turner Designs.

### *Preparación de los reactivos*

Para preparar acetona al 90% mezclar 1000 ml de acetona con 110  $\text{cm}^3$  de agua MilliQ. En una botella nueva de acetona, queda normalmente suficiente espacio vacío para añadir el agua Milli-Q dentro de la misma botella.

Para preparar ácido clorhídrico al 10% hay que añadir 10 ml de ácido clorhídrico concentrado a 90 ml de agua Milli-Q.

## Calibración

El fluorómetro puede calibrarse con un estándar de Clor *a* pura (Sigma). Adicionalmente puede usarse un extracto acetónico (obtenido tras filtración de agua de mar) cuya concentración de Clor *a* se haya medido en un espectrofotómetro. Se recomienda comprobar la calibración al menos una vez en cada etapa.

### *Calibración con Clor a pura*

Se disuelve el estándar en acetona 90% y al cabo de unas dos horas se mide su concentración mediante un espectrofotómetro, mediante la fórmula

$$\text{Clor } a \text{ (mg l}^{-1}\text{)} = (A_{\text{max}} - A_{750}) / (E \cdot C) \cdot (1000 \text{ mg/l g})$$

donde  $A_{\text{max}}$  es la absorbancia en el máximo de absorción (664 nm),  $A_{750}$  es la absorbancia a 750 nm, que se usa para corregir la turbidez,  $E$  es el coeficiente de extinción de la Clor *a* en acetona 90% a 664 nm ( $87.67 \text{ l g}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) y  $C$  (cm) es la longitud de camino óptico en la cubeta.

A partir de este estándar se preparan cinco diluciones y se lee su fluorescencia, antes y después de acidificar con 3 gotas de HCl 10%. El factor de calibración se calcula como la pendiente de la lectura del fluorómetro en relación con el contenido de Clor *a* en cada dilución.

### *Calibración con un extracto acetónico concentrado*

Se filtran 1-5 litros de agua de mar (según la abundancia de fitoplancton) sobre un filtro Whatman GF/F (preferiblemente de 25 mm de diámetro; puede ser también de 47 mm), que se congela como en el caso de los filtros destinados a fluorimetría y se introduce en un tubo con 7 ml de acetona 90%. La extracción se realiza en nevera y a oscuras, durante un período de unas 24 horas. Previamente a la medición de la absorbancia, hay que centrifugar los extractos durante unos 15 minutos. Después de la centrifugación, se traspa cuidadosamente el sobrenadante, con una pipeta Pasteur, a otro tubo o a la cubeta del espectrofotómetro.

Mediante un espectrofotómetro se mide la absorbancia del extracto a 750, 664, 647 y 630 nm. La concentración de Clor *a* de este extracto se calcula a partir de la fórmula tricromática de Jeffrey y Humphrey (1975):

$$\text{Clor } a \text{ (mg l}^{-1}\text{)} = (11.85 (A_{664} - A_{750}) - 1.54 (A_{647} - A_{750}) - 0.08 (A_{630} - A_{750})) / C$$

donde  $C$  es el camino óptico (en cm) de la cubeta.

A partir de este punto, se calcula el factor del fluorómetro como se indica en la sección anterior.

## Descripción de la técnica

### *Muestreo*

Se tomarán muestras de agua de las mismas 5 profundidades de producción primaria (y si es posible de las mismas botellas Niskin) y de 5 profundidades adicionales (el conjunto de 10 niveles será el mismo seleccionado para picofitoplancton). Se procurará que las muestras no queden expuestas a iluminación intensa.

### *Filtración*

#### **- Determinación de clorofila total (en principio para las 10 profundidades):**

Filtrar 200-500 ml de agua (la cantidad puede variar en función de la concentración de clorofila y del factor del fluorómetro) a través de un filtro GF/F de 25 mm de diámetro. Con este filtro se analizará la clorofila a total. La presión de vacío ha de ser inferior a 100 mm Hg.

#### **- Profundidades de producción primaria:**

En las tres profundidades con fraccionamiento: filtrar 200-500 ml de agua a través de una rampa de filtración con una secuencia de filtros de policarbonato de 20, 2 y 0.2  $\mu\text{m}$  de tamaño de poro y 47 mm de diámetro. La presión de vacío ha de ser inferior a 100 mm Hg.

En las dos profundidades sin fraccionamiento: filtrar 200-500 ml de agua a través de un filtro de policarbonato de 0.2  $\mu\text{m}$  de tamaño de poro y 47 mm de diámetro. La presión de vacío ha de ser inferior a 100 mm Hg.

Se compararán las determinaciones de clorofila total derivadas de filtros GF/F con las obtenidas directamente mediante filtros de policarbonato de 0.2  $\mu\text{m}$  o a partir de la suma de fracciones. Si la correspondencia es satisfactoria, podría eliminarse la repetición de los filtros de GF/F para las clorofilas totales de algunas de las profundidades de producción primaria.

### *Congelación de los filtros*

- Anotar el volumen filtrado de cada muestra y fracción en el estadillo (véase anexo).
- Doblar el filtro dejando el filtrado en la parte interior (se debe evitar que el filtrado toque el papel de plata).
- Envolver el filtro en papel de plata y apuntar el número de tirada de CTD, la profundidad y la fracción.
- Congelar los filtros a -20 °C como mínimo durante 6 horas (si conviene, se pueden tener congelados durante más tiempo).

### *Preparación del extracto acetónico*

Antes de sacar los filtros del congelador hay que llenar de acetona 90%, con el dosificador, los tubos blancos de centrifuga. El volumen de acetona

debe ser de 5-7 ml (5 ml son suficientes; comprobad el volumen que sale del dosificador dos o tres veces con un tubo graduado de vidrio hasta que el volumen salga constante (la primera tirada siempre tiene menos volumen). Tapad siempre muy bien los tubos (la acetona se evapora muy rápidamente). Anotad el volumen de acetona en el estadillo.

- Sacad los filtros del congelador e introducidlos en los tubos cuidando de que el filtro esté completamente sumergido en la acetona; apuntad el número de tubo que tiene cada muestra y fracción en el estadillo.
- Dejad los tubos a oscuras y en la nevera unas 24 horas.

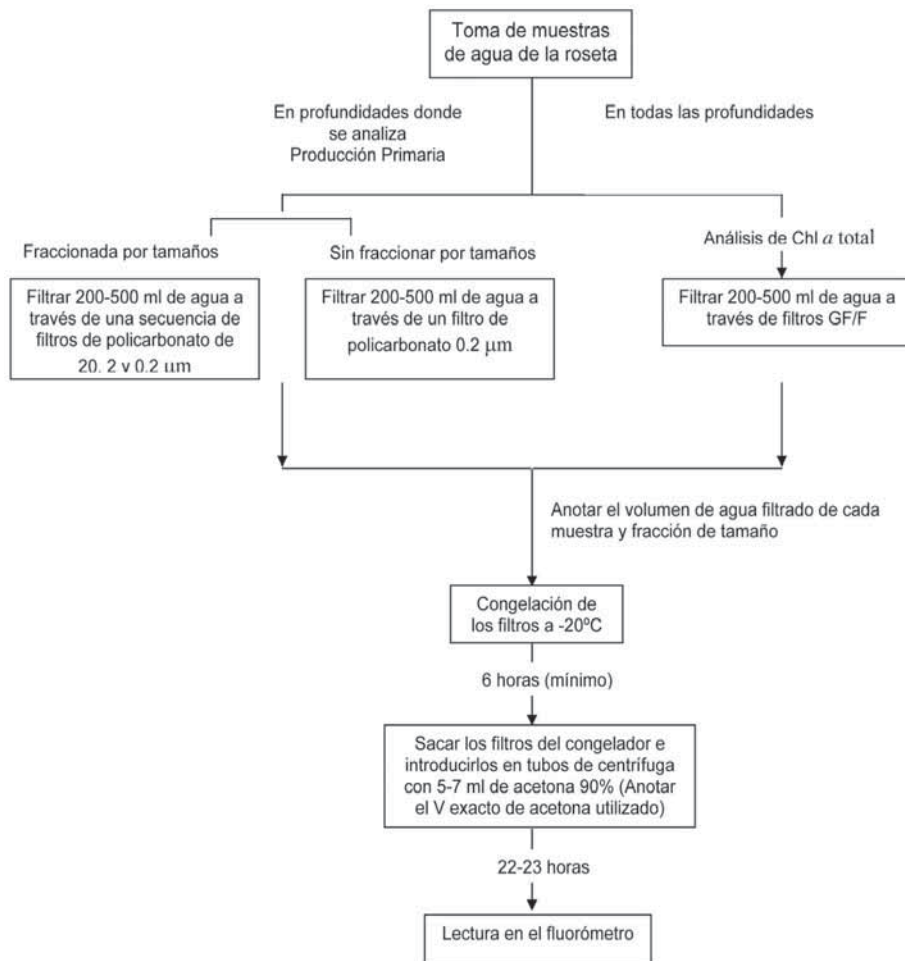
### *Lectura de la fluorescencia*

- Sacad los tubos de la nevera y agitadlos suavemente, cuidando de que el filtro vuelva a quedar sumergido. Dejad los tubos a temperatura ambiente durante una hora antes de leerlos.
- Poned en marcha el fluorómetro al menos 30 minutos antes de leer las clorofilas (se debe enchufar el transformador a la corriente y apretar el botón rojo del fluorómetro).
- Llenad un tubo de vidrio con acetona, introducidlo en el fluorómetro y leed la señal (esto será el blanco y lo debéis anotar en la columna correspondiente).
- Verted la acetona de la muestra en un tubo de vidrio y leed la señal; apuntad la lectura en la columna del estadillo Rb (lectura antes de la acidificación), sacad el tubo y añadid 3 gotas de ácido clorhídrico 10%. Volved a leer después de añadir el ácido y apuntad la lectura en la columna Rac (lectura después de la acidificación). Después de leer las muestras apagad el fluorómetro (botón rojo) y desenchufad el transformador de la corriente.
- Lavad los tubos con agua del grifo (unas 4 o 5 veces) y con agua Milli-Q (una vez). NUNCA uséis ácido para lavar los tubos de clorofila.
- Copiad los valores de volumen filtrado, volumen de extracción (= volumen acetona), blanco y lecturas en el estadillo Excel de clorofilas y arrastad las formulas de los cálculos.

### *Notas:*

- Usad siempre lápiz para cualquier anotación del análisis de clorofila (si cayera una gota de acetona sobre bolígrafo o rotulador, perderíais la información).
- Trabajad tan a oscuras como sea posible.
- Los filtros de policarbonato se manipulan mejor si se humedecen con agua de mar filtrada.

## Cuadro sinóptico de la técnica



## Cálculo de los resultados

La concentración de Clorofila *a* en la muestra de agua se calcula mediante la fórmula:

$$\text{Clor } a \text{ (mg m}^{-3}\text{)} = F \cdot (Rb - B) \cdot V_e / V_m,$$

donde  $F$  es el factor del fluorómetro,  $Rb$  la lectura de la fluorescencia antes de acidificar,  $B$  es la lectura correspondiente al blanco de acetona 90%,  $V_e$  es el volumen de extracto acetónico en ml y  $V_m$  el volumen de muestra filtrado en litros.



## Control de calidad

En general, se trata de un método muy robusto. Como control de calidad es útil procesar muestras duplicadas extraídas del mismo frasco de muestreo. También es interesante procesar frascos de muestreo duplicados, procedentes de la misma botella Niskin, pero en este caso ya entran fuentes de variabilidad adicionales a las del análisis propiamente dicho.

## Referencias

- JEFFREY, S. W., G. F. HUMPHREY. 1975. «New spectrophotometric equations for determining chlorophylls *a*, *b*, *c*<sub>1</sub> and *c*<sub>2</sub> in higher plants, algae and natural phytoplankton». *Biochem. Physiol. Pflanzen*. 167: 191-194.
- KNAP, A., A. MICHAELS, A. CLOSE, H. DUCKLOW, A. DICKSON (eds.). 1996. *Protocols for the Joint Global Ocean Flux Study (JGOFS) Core Measurements*. JGOFS Report Nr. 19, vi+170 pp.
- YENTSCH, C. S., D. W. MENZEL. 1963. «A method for the determination of phytoplankton chlorophyll and phaeophytin by fluorescence». *Deep-Sea Res.* 101: 23-32.



# Análisis de pigmentos fotosintéticos del fitoplancton mediante HPLC

<sup>1</sup>Rodríguez Hernández, F.; <sup>2</sup>Latasa Arcalís, M.

<sup>1</sup> C.O. Vigo. Instituto Español de Oceanografía

<sup>2</sup> C.O. Gijón. Instituto Español de Oceanografía

## Finalidad. Campo de aplicación

Toma de muestras sobre las que posteriormente se llevará a cabo análisis de pigmentos fotosintéticos (clorofilas y carotenoides) del fitoplancton, empleando cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC).

## Conceptos generales

Uno de los objetivos principales en los estudios de oceanografía biológica es determinar la abundancia y distribución de los diferentes grupos taxonómicos del fitoplancton. Para ello se emplean múltiples técnicas basadas en el análisis taxonómico mediante características morfológicas, genéticas y químicas. El análisis de la composición de pigmentos mediante HPLC pertenece a esta última categoría, ya que permite la cuantificación de compuestos individuales, clorofilas y carotenoides. Su gran diversidad y distribución desigual entre las clases algales (e incluso géneros y especies concretas) confiere a los pigmentos un valor químico-taxonómico y nos permiten reconstruir la composición de grupos en muestras naturales. El procesado e interpretación de los datos requiere conocimientos sobre la composición pigmentaria en cultivos de laboratorio así como la utilización de herramientas analíticas como regresión múltiple o programas específicos (*software* CHEMTAX: Chemical Taxonomy; Mackey et ál. 1996).

## Equipamiento necesario

Rampas de filtración; bomba de vacío; congelador (-20 y -80 °C).

## Reactivos u otro material fungible

- Botellas de muestreo de 2 L. Tubo de silicona.
- Filtros Whatman de fibra de vidrio (25 y 47 mm; tipo Whatman GF/F) y policarbonato (47 mm, 5 micras de poro; tipo Nucleopore).
- Tubos eppendorf (o crioviales 2 ml) y pinzas metálicas tipo Millipore.
- Frasco lavador. Papel de filtro de laboratorio.
- Conexiones para tubos de silicona.

## Calibración

La calibración se lleva a cabo en el laboratorio, empleando patrones de pigmentos representativos (clorofilas y carotenoides) de aquéllos que dominan en las muestras naturales. Dichos patrones consisten en pigmentos individuales comerciales, que previa cuantificación en un espectrofotómetro, sirven para realizar una recta de calibrado en el HPLC, que nos permitirá determinar la concentración de los pigmentos detectados en muestras naturales. Los patrones se cuantifican en el espectrofotómetro basándose en los coeficientes de extinción molar disponibles para cada pigmento (Jeffrey et ál. 1997).

## Descripción de la técnica

Se harán filtraciones para muestras de pigmentos totales y para muestras de pigmentos fraccionadas por tamaño. Las muestras se recogerán a las profundidades seleccionadas en las medidas de producción primaria (al menos 5 profundidades, incluyendo 5 m y el DCM). Para pigmentos totales, la filtración por filtros Whatman GF/F de 25 mm de diámetro se realizará empleando bombas EYELA y rampas de filtración para volúmenes grandes (hasta 4 litros). La presión de filtrado no deberá exceder 0.03 MPa. El volumen de agua filtrada dependerá de la clorofila a estimada mediante el fluorómetro acoplado al CTD (desde 1.5 litros en las zonas más productivas hasta 4 litros en regiones oligotróficas). A las profundidades de 5 m y del DCM se harán filtraciones fraccionadas mediante filtración secuencial a través de filtros Nucleopore de 5 micras y filtros Whatman GF/F de 47 mm de diámetro. Elegimos 5 micras para separar el nano-

plancton y microplancton de mayor tamaño para facilitar el filtrado de grandes volúmenes respecto a los filtros de 2 micras. De este modo podemos separar la fracción de picoplancton y pequeño nanoplancton respecto al total. Se utilizará la misma presión que para las muestras de pigmentos totales.

### *Preparación para la toma de la muestra*

- Preparar un frasco lavador con agua de mar filtrada.
- Preparar un estadillo en el que se detallarán las estaciones, profundidades y fracciones de tamaño muestreadas, hora y día del muestreo, así como un apartado para observaciones.

Antes de cada filtración hay que tener disponible sobre la poyata un número suficiente de crioviales de 2 ml o microtubos eppendorf en una gradilla protegida de la luz. El etiquetado de los mismos deberá incluir el nº de estación, profundidad y fracción de tamaño. Dichos códigos deben coincidir con los especificados en el estadillo de muestras.

- Colocar los filtros y las torres de filtración. Para la filtración secuencial colocar 2 o 3 soportes Sartorius en serie (tener en cuenta las condiciones de balanceo del barco cuando se quiera poner 3 soportes en serie). Colocar el filtro con poro menor en el soporte más bajo y el de poro mayor en el soporte más alto.

### *Toma de la muestra*

- Origen del material biológico: La profundidad de toma de las muestras corresponderá a aquellas seleccionadas en las medidas de producción primaria (generalmente 5 profundidades, entre 5m y el DCM). La elección de profundidades debe hacerse de forma congruente con el resto de variables fitoplanctónicas analizadas, tales como citometría, viabilidad celular, metabolismo y producción primaria.

- Tamaño de la muestra: Para asegurar la filtración de una cantidad suficiente de células que permita obtener una señal cuantificable mediante HPLC es aconsejable comprobar la clorofila (Chl) a estimada mediante el fluorómetro acoplado al CTD. Volúmenes de 1.5 L son suficientes para zonas productivas ( $> 0.25 \mu\text{g/L Chl } a$ ) pero puede necesitarse 2 botellas por profundidad (hasta 4 L) en regiones oligotróficas.

- En las profundidades de superficie y DCM se debe tomar el doble de muestra para llevar a cabo la filtración secuencial (fraccionamiento de tamaño) en estas 2 profundidades.

- Toma de muestra: se realizará con tubos de silicona de 8 mm de diámetro interno. Enjuagar 1 vez la botella con la muestra y llenar y tapar la botella protegiéndola de la luz directa.

### *Filtración de la muestra*

- Se realizarán filtraciones “directas” y en serie mediante las rampas de filtración y los tamaños y tipos de filtro indicados anteriormente.

Filtración por filtros de 25 mm (directa).

1. Llenar todas las torres Millipore con agua filtrada y con las llaves de paso de la rampa cerradas. Encender la bomba Eyela que debe contener agua para que succione y un tubo de vaciado hasta la pica.
2. Comprobar ahora y no durante la filtración que la presión que marca el manómetro de la bomba Eyela oscila alrededor de 0.025 MPa. Ojo que la regulación es poco precisa. Para evitar en lo posible la rotura de células es aconsejable que la presión de vacío no supere 0.03 MPa. En cualquier caso, el proceso de filtración no debe durar más de 90 min y se debe incrementar la presión o parar la filtración (y medir y anotar el volumen no filtrado) cuando se supere este tiempo.
3. Colocar un tubo de los tubo/conexión en la botella de muestra.
4. Abrir la llave de paso de la rampa.
5. Cuando comience a succionar colocar el tapón del tubo/conexión y asegurarse que succiona la muestra.
6. Continuar con todas las botellas como en la Figura 1.

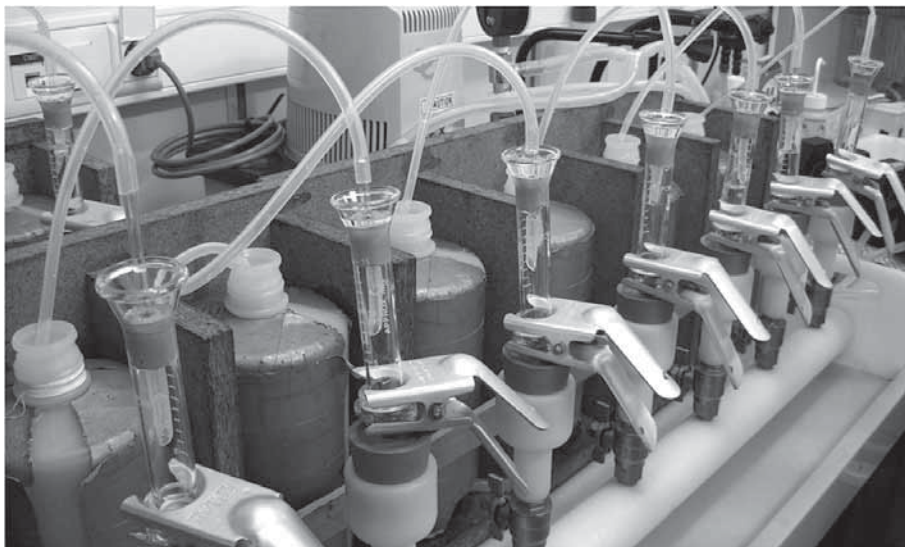


Figura 1. Filtración de las muestras.

*Filtración secuencial por filtros de 47 mm*

1. Mantener las llaves de paso cerradas.
  2. Retirar uno de los 3 tapones de las tapas de las torres Sartorius.
  3. Verter la muestra y dejar que la(s) copa(s) inferior se llene por gravedad.
  4. Una vez llena la copa inferior, abrir la llave de paso.
  5. Ir rellenando la copa superior.
- Mantener siempre el filtro mojado. Si la columna de agua por encima del filtro es  $<1$  cm cerrar la llave de paso, retirar el tapón, rellenar la torre con agua de mar filtrada, abrir la llave y colocar el tapón.
  - Comprobar que la presión de la bomba no varía durante el proceso de filtración. El manómetro no lee de forma correcta cuando succiona agua; asegurarse que el valor mínimo que marca es aproximadamente 0.025 MPa. Si existe alguna fuga, intentar arreglarla. Si no es posible, utilizar los 2 succionadores de la bomba Eyela con una conexión Y (mirar las instrucciones de la bomba en caso de duda). (Ver Figura 2).



Figura 2. Bomba de filtración.

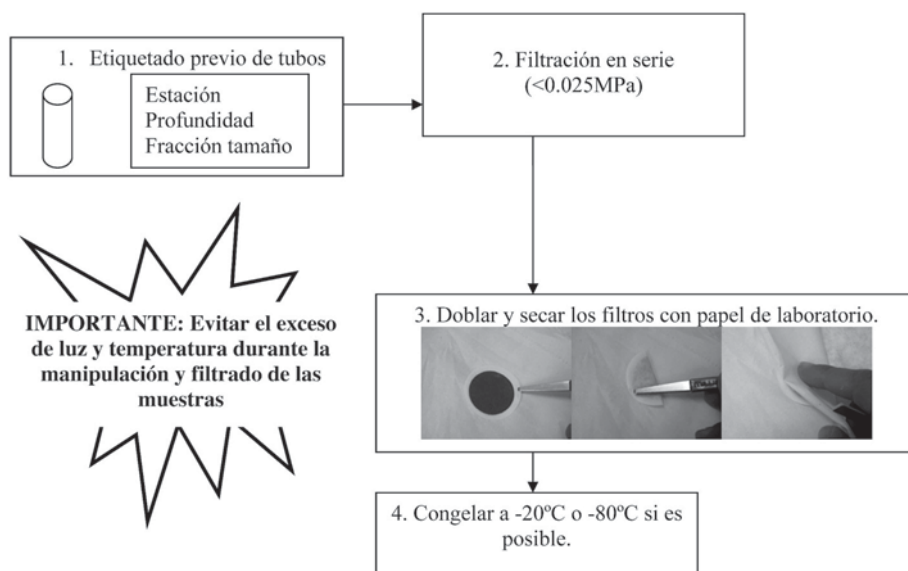
- Comprobar que los filtros están secos antes de retirar las copas de filtración. Las pinzas de punta plana tipo Millipore son más cómodas para manipular los filtros, que deberán ser doblados cuidadosamente sin tocar la parte central superior que contiene la muestra. Una vez doblados, presionar sobre el filtro usando papel de laboratorio hasta que no deje restos de humedad. Debe evitarse el agua residual del filtro ya que interfiere en el proceso de extracción de pigmentos. Introducir los filtros lo más pronto posible en los microtubos y protegerlos del exceso de luz durante su manipulación. Es importante congelar las muestras inmediatamente tras su reco-

gida a -20 °C (< 2 horas), hasta que acaben de filtrarse todas las muestras de la estación que es cuando se trasladarán de forma definitiva a -80 °C en cada campaña.

- Proceso en el laboratorio: se realiza la extracción de la muestra mediante disolventes orgánicos (metanol 95% o acetona 90%) y el análisis mediante HPLC empleando métodos previamente publicados (Zapata et ál. 2000).

- Final: la tarea se completará con la cuantificación de pigmentos (en base a la calibración previa del sistema con patrones comerciales de pigmentos) y la reconstrucción de la composición de grupos del fitoplancton utilizando el programa CHEMTAX y/o herramientas de regresión múltiple.

### Cuadro sinóptico de la técnica



### Cálculo de los resultados

Para determinar la concentración de pigmentos, primero se determina la concentración de pigmento en nuestro extracto. A partir de este dato, se relacionan los volúmenes de filtrado y extracción mediante la siguiente fórmula:

Concentración real pigmento (ng/l) = (ng totales del pigmento/ vol. muestra inyectada (ml)) \* vol. extracto (ml) \* vol. filtrado (l).



## Control de calidad

La técnica de HPLC es robusta en el sentido de que los valores obtenidos dependen de la calidad de la calibración de los pigmentos patrones, y de la precisión en la medida de los volúmenes de filtrado, extracción e inyección en el equipo.

## Referencias

- JEFFREY, S. W., R. F. C. MANTOURA, T. BJØRNLAND. 1997. «Data for the identification of 47 key phytoplankton pigments». En: JEFFREY, S. W., MANTOURA, R. F. C., WRIGHT, S. W. (eds.), *Phytoplankton pigments in oceanography: guidelines to modern methods, UNESCO monographs on oceanographic methodology*. UNESCO, Paris, pp. 449-559.
- MACKEY, M. D., D. J. MACKEY, H. W. HIGGINS, S. W. WRIGHT. 1996. «CHEMTAX – a program for estimating class abundance from chemical markers: application to HPLC measurements of phytoplankton». *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 144: 265-283.
- ZAPATA, M., F. RODRÍGUEZ, J. L. GARRIDO. 2000. «Separation of chlorophylls and carotenoids from marine phytoplankton: a new HPLC method using a reversed phase C8 column and pyridine-containing mobile phases». *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 195: 29-45.



# Muestreo de cocolitóforos

Estrada, M.

*Institut de Ciències del Mar (CSIC)*

## Finalidad. Campo de aplicación

Identificación y cuantificación de cocolitóforos. Estas microalgas poseen una cubierta de plaquitas calcáreas o cocolitos. En muestras de agua fijadas tiene lugar una importante disolución de estos cocolitos; por ello, en este método, la muestra de agua se filtra lo más rápidamente posible, sin fijación previa. Es importante, además, que el lavado sea con agua que no sea ácida; por ello, debe utilizarse agua mineral adecuada.

El rango de medición depende de la cantidad de agua filtrada y de la concentración de cocolitóforos en esta agua. Estos datos no se suelen conocer con antelación a la toma de muestras, por lo que aquí se dan recomendaciones generales.

## Conceptos generales

Los cocolitóforos caracterizan el grupo funcional de fitoplancton calcificador y tienen gran importancia en los balances carbónico-carbonatos del océano. A corto plazo, la calcificación asociada a la formación de cocolitos libera CO<sub>2</sub> al medio; a escalas geológicas, sin embargo, la sedimentación de cocolitos al fondo del océano contribuye a secuestrar una importante cantidad de carbono.

## Equipamiento necesario

- Frascos de plástico de 0.5 l para el muestreo.
- Rampa de filtración.
- Estufa o fiambarrera de plástico en la que se pueda hacer el vacío.

## Reactivos u otro material fungible

Filtros de policarbonato de 0.6 o 0.8  $\mu\text{m}$  de diámetro de poro y 25 mm de diámetro de filtro.

Filtros de soporte de ésteres de celulosa (de 3-5  $\mu\text{m}$  de tamaño de poro; este filtro se puede reutilizar).

Cápsulas de plástico para secar y para guardar los filtros. Sirven cápsulas de Petri. En cada una de ellas se pueden acondicionar 5-6 filtros que se fijan mediante cinta adhesiva o un trocito de Post-it enganchado en un extremo.

Agua mineral (no se puede utilizar agua destilada porque disuelve los cocolitos).

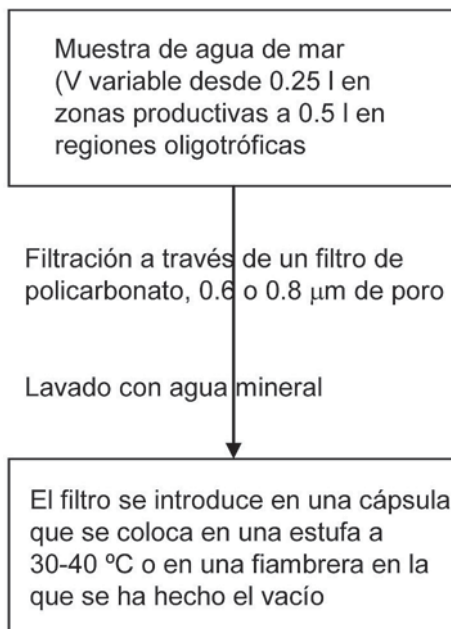
## Calibración

No aplicable. Las muestras se examinan en el laboratorio por medio de un microscopio electrónico de barrido.

## Descripción de la técnica

En las estaciones seleccionadas, se tomarán muestras de 3 m de profundidad, el DCM y el DCM+20m (si hubiese problemas de volumen de agua, se podría tomar una muestra del continuo). Se filtrarán de 300 a 500 ml de agua (el volumen será mayor en zonas más oligotróficas) a través de filtros de policarbonato de 0,6 o 0,8  $\mu\text{m}$  de tamaño de poro y 25 mm de diámetro, que se colocarán sobre un filtro de soporte de ésteres de celulosa de 3-5  $\mu\text{m}$  de tamaño de poro; este filtro sirve solo como cojín del filtro superior de policarbonato y se puede reutilizar (se recomienda este tipo de material porque es de uso corriente y tiene un grosor adecuado). Una vez filtrada el agua de mar se lavará el filtro de policarbonato con 1 ml (aproximadamente) de agua mineral (es recomendable echarla con una jeringa a la que se ha colocado un filtro de 0.2  $\mu\text{m}$  en la punta; también se puede echar con una pipeta Pasteur). Se saca el filtro, se introduce, con el filtrado en la parte superior, en una cápsula y se deja secar durante unos minutos (en un desecador o encima de la poyata, procurando protegerlo del polvo y de vapores ácidos). Una vez seco, se escribe cuidadosamente el número de identificación en un extremo del filtro y se introduce este en una placa de Petri, a la que se fija con un poco de cinta adhesiva transparente (caben unos 5-6 filtros en cada placa de Petri). Una vez llena, se sella la placa con cinta adhesiva. Conviene guardar las placas de Petri llenas en una estufa a 30-40 °C o en un recipiente hermético hasta su traslado al laboratorio de tierra. Es importante no invertir el filtro (para evitar pérdidas de material filtrado) y evitar su exposición a vapores ácidos.

### Cuadro sinóptico de la técnica



### Cálculo de los resultados

Debe apuntarse el volumen de agua filtrado y la superficie útil de filtración.

### Control de calidad

Es importante filtrar la muestra con prontitud, mantener limpio el material de filtración y evitar la exposición del filtro a vapores ácidos.

### Referencias

CROS, L., J.-M. FORTUÑO. 2002. «Atlas of Northwestern Mediterranean coccolithophores». *Sci. Mar.*, 66 (Sppl. 1): 1-186.



# Muestreo de fitoplancton por medio de redes

Estrada, M.

*Institut de Ciències del Mar (CSIC)*

## Finalidad. Campo de aplicación

Esta metodología de muestreo tiene como objetivo filtrar grandes volúmenes de agua y concentrar cantidades importantes de microfitoplancton. La principal desventaja de las redes es que no son adecuadas para muestreos cuantitativos, entre otras razones porque la composición taxonómica de la comunidad retenida depende del tamaño de malla y de características de la misma comunidad. Además, es difícil determinar el volumen de agua filtrado.

## Conceptos generales

Se trata de un método cualitativo para contribuir a estimar la biodiversidad del microfitoplancton en la zona de muestreo

## Equipamiento necesario

Red de fitoplancton de 37  $\mu\text{m}$  de tamaño de poro provista de un peso adecuado (el tamaño de poro seleccionado representa un compromiso entre el tamaño del plancton retenido y la posibilidad de filtrar un volumen importante de agua).

## Reactivos u otro material fungible

- Bote de plástico o vidrio de 250 ml para recoger el material biológico.
- Fijadores Formol-hexamina y Lugol ácido.

### *Fabricación de los fijadores*

#### **Formol-hexamina:**

Se diluye formol (aldehído fórmico al 40%) con un volumen igual de agua destilada (se obtiene aldehído fórmico al 20%) y se añaden 100 g de hexametilentetramina (hexamina) por cada litro de esta solución (puede quedar polvo sin disolver en el fondo del frasco).

#### **Lugol ácido:**

Se disuelven 100 g de KI en 1 litro de agua destilada; se disuelven seguidamente 50 g de yodo cristalino y se añaden 100 ml de ácido acético glacial.

### **Descripción de la técnica**

#### *Arrastres verticales u oblicuos*

La red deberá ir provista de un peso adecuado (puede engancharse al final del cable o de modo que quede por debajo del cubilete). Se bajará la red hasta unos 200 m y se izará a una velocidad que no supere  $0.5 \text{ m s}^{-1}$ . Si se necesita más biomasa, puede hacerse un arrastre oblicuo. En este caso, la bajada e izado de la red se hacen mientras el barco está en movimiento.

#### *Arrastres horizontales*

Se baja la red a una profundidad determinada (idealmente determinada con un sensor; si no, se estima a partir de la longitud de cable largado y el ángulo del cable) se arrastra durante un tiempo a esta profundidad. La velocidad de arrastre es de unos 2-3 nudos. El tiempo de arrastre depende de la abundancia de fitoplancton en la zona (por ejemplo, 10 minutos).

#### *Recogida de la muestra*

Después del arrastre, se rociará la red con agua de mar para hacer bajar el material adherido al tejido de la manga hacia el cubilete y se verterá el contenido de este en un bote de plástico o de vidrio (de 250 ml), al que se añadirá la cantidad necesaria de fijador (véase más abajo). Es importante que las muestras queden bien tapadas; las botellas de plástico suelen dar problemas en este aspecto. Indicar en el frasco la fecha, la estación, el tipo de pesca y la profundidad alcanzada.

#### *Fijación de la muestra*

No hay un fijador que vaya bien para todos los grupos de fitoplancton. Uno de los más utilizados es el formol-hexamina. Dinoflagelados y flagela-



dos desnudos se conservan mejor con Lugol (pero este, sobre todo si es Lugol ácido, va mal para los cocolitóforos). A veces, puede ser conveniente conservar muestras duplicadas en formol-hexamina y en Lugol.

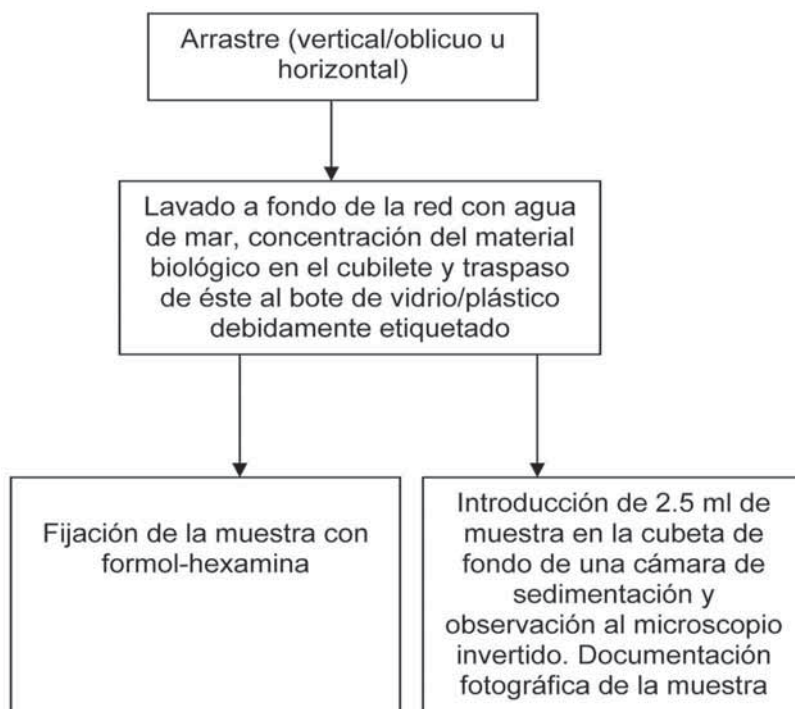
Formol-hexamina: En muestras densas se añadirán unos 20 ml por 100 ml de muestra (para muestras de agua no concentradas se utilizan 2 ml de formol-hexamina por 100 ml de muestra).

Lugol: Se añade la cantidad de fijador necesaria para que la muestra adquiera un color marrón pálido.

### *Documentación fotográfica de la muestra*

Es interesante hacer observaciones de plancton vivo. Para ello, antes de la fijación se tomará una pequeña cantidad de muestra (unos 2.5 ml) que se introducirá en la parte del fondo de una cubeta de sedimentación y se observará con el microscopio invertido. Se tomarán fotografías de conjunto y de organismos interesantes que se hayan detectado (es importante que el nombre de las fotos sea suficientemente explícito para que después no haya confusiones).

### Cuadro sinóptico de la técnica



## Cálculo de los resultados

Hay que anotar el diámetro y tipo de malla de la red, el tipo de arrastre (vertical, horizontal, oblicuo), tiempo de arrastre, velocidad del barco, longitud de cable largado. En teoría, si se observan  $N_m$  células en  $v$  mililitros de muestra, la abundancia in situ ( $N_{is}$ ) se podría calcular como:

### *Arrastres verticales (a barco parado)*

$N_{is} = (N_m/v) * V_m / (b * \pi r^2)$ , donde  $V_m$  es el volumen total de muestra,  $r$  es el radio de la manga y  $b$  es la profundidad de muestreo.

### *Arrastres horizontales y oblicuos*

$N_{is} = (N_m/v) * V_m / (s * t * \pi r^2)$ , donde  $V_m$  es el volumen total de muestra,  $s$  es la velocidad del barco durante el arrastre,  $t$  el tiempo de arrastre y  $r$  el radio de la manga.

En las dos fórmulas anteriores, el paréntesis de la derecha representa el volumen de agua filtrado por la manga; puede ser estimado directamente si se dispone de un medidor de flujo.

En la práctica, sin embargo, tales expresiones son poco útiles, porque parte del agua que pasa por la boca de la malla acaba volviendo hacia afuera sin filtrarse.

## Control de calidad

Hay que lavar bien las redes después de cada utilización. Esto puede hacerse, en principio, enjuagando con agua de mar, pero hay que tener en cuenta que este sistema no elimina del todo la contaminación entre muestras. Si se pasa de una zona rica a una pobre debería lavarse la red con detergente y agua dulce (para más detalles véase Tangen, 1978).

El yodo de las muestras fijadas con Lugol es fotosensible y volátil. Hay que cuidar que las muestras almacenadas queden protegidas de la luz y de temperaturas demasiado altas o que puedan dar lugar a congelación.

## Referencias

TANGEN, K. 1978. NETS. EN: SOURNIA, A. (ed.), *Phytoplankton Manual*. UNESCO, París, pp. 50-58.

# Muestreo de fitoplancton desde las botellas Niskin

Estrada, M.

*Institut de Ciències del Mar (CSIC)*

## Finalidad. Campo de aplicación

Cuantificación de la abundancia fitoplanctónica a partir de muestras de agua tomadas de las botellas Niskin de la roseta del *BIO Hespérides*.

Las muestras se introducen en un frasco y se fijan para su estudio posterior mediante la técnica del microscopio invertido. Para ello, se sedimenta un volumen de muestra (generalmente unos 100 ml, para aguas oceánicas) en una cámara de sedimentación compuesta (constan de un cilindro que reposa sobre una cubeta de 5 mm de alto con un vidrio muy delgado de fondo). Al cabo de un tiempo (unas 72 horas para 100 m de muestra), el fondo de la cubeta se examina a diversos aumentos.

## Conceptos generales

Este método de muestreo sirve básicamente para estimar la abundancia y composición de las poblaciones de nano y microfitoplancton; no es adecuado para picofitoplancton. Hay que tener en cuenta también que una gran parte de los flagelados desnudos se degradan rápidamente en muestras fijadas.

## Equipamiento necesario

Botellas Niskin de la roseta (para aguas superficiales sirve cualquier otro sistema, por ejemplo, un cubo, que permita extraer agua sin agitarla excesivamente).

## Reactivos u otro material fungible

Botes de vidrio de color ámbar de 250 ml.

Hay que utilizar vidrio de calidad suficiente para evitar el desprendimiento de láminas. El siguiente material ha dado buen resultado en el IEO:

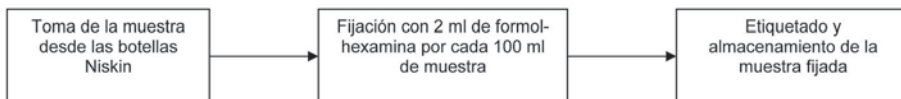
- Frasco de vidrio con tapa de rosca, boca ancha, color ámbar de Afora, de 125 ml, referencia Afora # LA 80125. Obturador número Afora # LA80010).
- Frasco de vidrio, con tapa de rosca, boca ancha color ámbar 250 ml, (“Frasco Merck”); Afora # LA80250. Obturador (para “Frasco Merck”) Afora # LA80011.

**Fijadores:** formol-hexamina (para fabricación del fijador ver protocolo de cuantificación de fitoplancton mediante el uso de redes).

## Descripción de la técnica

Se llenarán frascos de vidrio de 250 ml, previamente enjuagados con la misma agua, con muestras de agua de 5 m, DCM y una profundidad intermedia (250 ml permitiría replicar la observación microscópica de la muestra, si fuese necesario; en caso de haber problemas de cantidad de agua de las botellas se podrían tomar solo 120 ml de muestra, suficientes para llenar una columna de sedimentación de 100 ml). Se añadirán 2 ml de formol-hexamina por cada 100 ml de muestra y se cerrará el frasco herméticamente. Indicar en el frasco la fecha, la estación/número de CTD y la profundidad de obtención de la muestra.

## Cuadro sinóptico de la técnica



## Control de calidad

Hay que cuidar de fijar las muestras lo más rápidamente posible y guardarlas al abrigo de la luz, de excesivo calor y de posibilidades de congelación.

# Cuantificación del metabolismo de la comunidad pelágica mediante el método Winkler

Navarro, N.

*Universidad Rey Juan Carlos*

## Finalidad. Campo de aplicación

Metodología para la determinación de las tasas de producción primaria bruta, neta y respiración de la comunidad planctónica mediante el método Winkler. Con ello se consigue una estima de la variación y biogeografía del metabolismo de la comunidad pelágica.

## Conceptos generales

Un predominio de la respiración sobre la producción planctónica (comunidad heterotrófica) se traduciría en un flujo de  $\text{CO}_2$  hacia la atmósfera, que será hacia el océano cuando dominen los procesos autotróficos, con importantes consecuencias en el balance de carbono global. Por tanto es crucial evaluar el metabolismo de las comunidades planctónicas, es decir, cuantificar la producción bruta (GPP), la producción neta (NCP) y la respiración (R) del plancton.

## Equipamiento necesario

- Incubadores de cubierta para las distintas profundidades.
- Refrigeradores de cubierta + bombas.
- Mallas de distinta transparencia.
- Titroprocesador.

## Reactivos u otro material fungible

Los reactivos preparados se guardarán en botellas de 1 l bien cerradas y color ámbar.

- Solución de Tiosulfato (0.01 N)

Disolver 2.9 g de Tiosulfato de Sodio pentahidrato,  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ , y 1 g de Carbonato Sódico,  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , en 1 l de agua destilada.

- Solución de Sulfato de Manganese (reactivo 1)

Disolver 365 g de Sulfato de Manganese monohidrato,  $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , en 1 l de agua destilada.

- Solución de Hidróxido de Sodio Iodo (reactivo 2)

Disolver 320 g de NaOH en 500 ml de agua destilada. Añadir en pequeñas cantidades y esperar a su disolución antes de añadir más cantidad. Después añadir 600 g de Ioduro de Sodio, NaI, cuando la solución está todavía caliente. Completar hasta 1 l con agua destilada.

- Ácido Sulfúrico (10 N)

Añadir poco a poco 280 ml de Ácido Sulfúrico concentrado a 500 ml de agua destilada. Esperar que se enfríe y completar hasta 1 l con agua destilada. También se puede comprar directamente ácido sulfúrico 10 N (más recomendable).

- Solución patrón de Iodato Potásico (0.01 N)

Secar Iodato Potásico,  $\text{KIO}_3$ , en la estufa a 105 °C durante 1 hora, y pesar exactamente 0.3567 g. Una vez enfriado, disolver en agua destilada (200-300 ml) calentando si es necesario; dejar enfriar y completar hasta 1 l con agua destilada.

## Calibración

### *Valoración de la solución de Tiosulfato Sódico*

Hay que valorar diariamente todas las botellas de tiosulfato que se utilicen. Se llenan 6-7 botellas Winkler (125 ml) de agua destilada sin  $\text{O}_2$ , y se añaden los reactivos en orden inverso, es decir:

- 1 ml de Ácido Sulfúrico 10 N. Agitar suavemente.
- 1 ml de Hidróxido Sódico Iodo. Agitar suavemente.
- 1 ml de Sulfato de manganese.

Se agitan y se toman 50 ml, a los que se agregan 5 ml de solución 0.01 N de  $\text{KIO}_3$ . Se deja reposar unos 2 minutos en la oscuridad, y se titula con el tiosulfato que se quiere valorar.

La normalidad exacta del tiosulfato vendrá dada por la fórmula:

$$N = (5/V) \times 0.01$$

V = ml de tiosulfato añadidos por el titulador.

**Nota:** El número de réplicas lo determinará el coeficiente de variación (error) calculado. Tomaremos como valor válido del tiosulfato cuando el error de la media sea del orden de  $10^{-5}$  - $10^{-6}$ .

### Descripción de la técnica

- Preparación de las muestras

El agua para las medidas de metabolismo de las distintas profundidades se sifona a cada botella DBO (125 ml), usando un tubo flexible cuya punta dejaremos en el fondo de cada botella, para que el flujo sea sin turbulencias y no gane oxígeno. En uno de los extremos del tubo se coloca una malla de 240 micras para prevenir la presencia de organismos más grandes en la muestra. Dejaremos que se desborde unos segundos (alrededor de dos veces el volumen de la botella) antes de colocar el tapón con cuidado de no atrapar burbujas.

- Incubación

Después de llenar 21 botellas por cada profundidad, se fijan las 7 botellas iniciales, se dejan en agua y tapadas, e inmediatamente después se trasladan 7 transparentes y 7 oscuras por profundidad a los incubadores de cubierta (Figura 1).



Figura 1. Las muestras de cada profundidad se incuban en cubierta durante 24 horas ajustando, mediante filtros y sistemas de recirculación de agua a través de refrigeradores, las condiciones de luz y temperatura de cada profundidad.

La temperatura de las distintas profundidades se consigue utilizando los refrigeradores de cubierta que consiguen enfriar la temperatura del agua de un tanque de hasta 100 l hasta unos 8-10 °C en la cubierta del buque. La luz se consigue mediante mallas o filtros de diferente transparencia.

#### ● Fijación

La concentración de oxígeno disuelto se determina mediante la técnica Winkler, siguiendo las recomendaciones de Carritt y Carpenter (1966), mediante un sistema de titración con detección potenciométrica (electrodo redox) (Oudot et ál. 1988).

Las 7 botellas iniciales transparentes por profundidad se fijan con los reactivos como se indica a continuación. Tras el proceso conoceremos el oxígeno inicial presente en la muestra. 24 h después, se titulan igualmente las botellas incubadas, y así se obtiene el oxígeno presente en el agua después de un día de respiración y fotosíntesis (botellas claras) y de solo respiración (botellas oscuras).

A cada botella DBO se le añade 1 ml de solución de Sulfato de Manganeso y seguidamente 1 ml de solución de Hidróxido Sódico Iodo. Añadir con la punta de la pipeta por debajo del agua en la botella DBO. Tapar con cuidado de que no queden burbujas y agitar vigorosamente hasta que el precipitado esté completamente dispersado.

Dejar que el precipitado sedimente al menos un tercio de la botella (al menos 6-8 horas). Se debe titular una vez se ha sedimentado ya que si se deja más tiempo los errores aumentan.

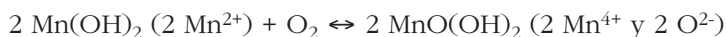
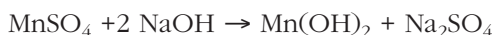
Cuando el precipitado ha sedimentado, añadir 1 ml de Ácido Sulfúrico 10 N colocando la punta de la pipeta por debajo de la superficie del agua. Tapar y agitar vigorosamente hasta que el precipitado se disuelva. Esperar un par de minutos.

Coger 50 ml con una pipeta aforada y trasladar a un vaso de plástico del titulador. Colocar el vaso en el brazo del titulador y comenzar la titulación con solución de tiosulfato. Este paso debe ser rápido para evitar que el yodo se volatilice. Limpiar el electrodo con agua destilada después de cada muestra.

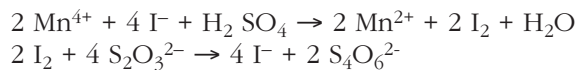
#### ● Principio teórico

La muestra se trata con excesos de sulfato manganoso y una base fuerte de yodo. El hidróxido de manganeso que se forma reacciona con el oxígeno disuelto en la muestra y forma un precipitado. Tras acidificación, en presencia de Ioduro, se libera Iodo en cantidad equivalente al oxígeno disuelto originalmente presente en la muestra. La cantidad de Iodo liberado se calcula mediante la titulación con tiosulfato sódico.

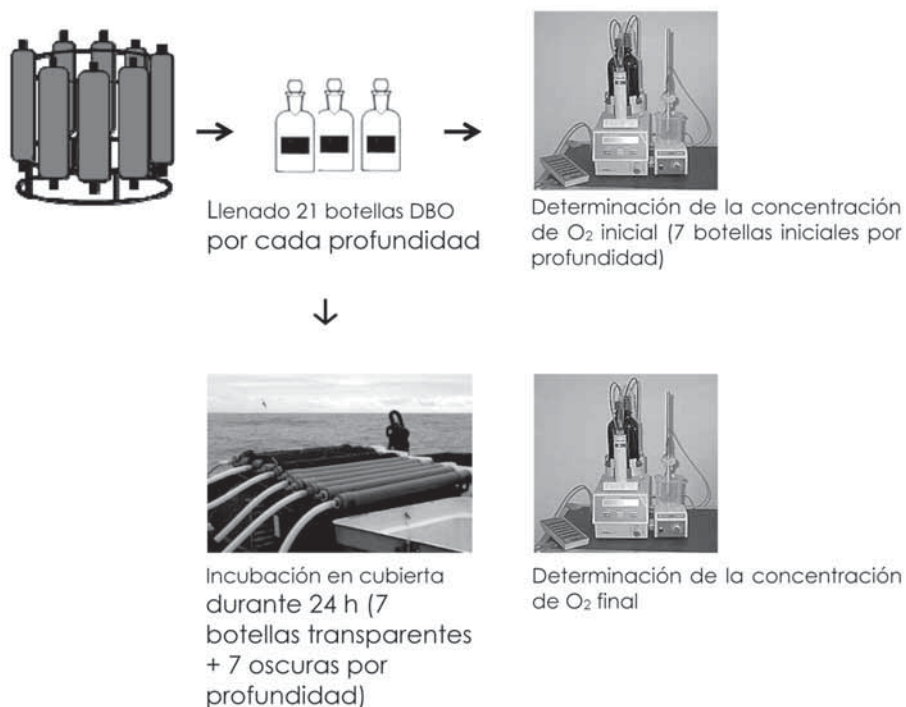
Las reacciones estequiométricas muestran que un equivalente de tiosulfato corresponde a 1/4 mol de O<sub>2</sub>.







### Cuadro sinóptico de la técnica



### Cálculo de los resultados

Para calcular la concentración de oxígeno disuelto se aplica la siguiente fórmula:

$$\text{mg/l}^{-1} \text{ Oxígeno Disuelto} = (V_B / V_B - V_{\text{rec}}) \times (N \times V / S) \times 8 \times 1000$$

$V_B$  = Volumen botella DBO (ml).

$V_{\text{rec}}$  = Volumen reactivos (2 ml).

$N$  = Normalidad del tiosulfato.

$V$  = ml de tiosulfato añadidos por el titulador.

$S$  = ml de muestra utilizados en la titulación (50 ml).

Restando el oxígeno presente en las botellas claras del inicial se obtiene la producción neta de la comunidad (NCP); y restando al inicial el

oxígeno en las botellas oscuras se obtiene la respiración de la comunidad (R). La producción primaria bruta (GPP) se calcula como la suma de R y NCP.

## Control de calidad

La manipulación de las muestras es fundamental para evitar errores en la determinación. Al llenar las botellas DBO hay que usar un tubo flexible cuya punta dejaremos en el fondo de cada botella, para que el flujo sea sin turbulencias y no gane oxígeno. Dejaremos que se desborde un volumen de aproximadamente dos veces el volumen de la botella antes de colocar el tapón, evitando que queden burbujas de aire.

Los reactivos se añaden con la punta de la pipeta por debajo del agua en la botella DBO y se tapan con cuidado para que no queden burbujas.

Hay que revisar bien los tubos del titroprocesador para que no haya ninguna burbuja de aire en el sistema.

Es importante realizar la valoración de las muestras iniciales y finales con la misma solución de tiosulfato. La precisión alcanzada en medidas repetidas debe ser mejor que  $0.01 \text{ ml l}^{-1}$  ( $0.014 \text{ mg l}^{-1}$ ), aunque dependiendo de las condiciones del mar y el rendimiento del titulador, la precisión puede variar entre  $0.005$  y  $0.03 \text{ ml l}^{-1}$  ( $0.007$  y  $0.042 \text{ mg l}^{-1}$ ) (Knap et ál. 1996).

**Limpieza:** hay que limpiar los dosificadores diariamente con ácido diluido en agua destilada y después aclararlos con agua destilada. Las botellas DOB se limpian diariamente con agua destilada y se dejan limpias para el siguiente muestreo. Al terminar cada campaña hay que desmontar y limpiar todo el titulador con agua destilada.

## Referencias

- CARRITT, D. E., J. H. CARPENTER. 1966. «Comparison and evaluation of currently employed modifications of the Winkler method for determining dissolved oxygen in seawater; a NASCO Report». *J. Mar. Res.* 24: 286-319.
- KNAP, A., A. MICHAELS, A. CLOSE, H. DUCKLOW, A. DICKSON (eds.). 1996. «Protocols for the Joint Global Ocean Flux Study (JGOFS) Core Measurements». *JGOFS Report* Nr. 19, vi+170 pp. Reprint of the IOC Manuals and Guides No. 29, UNESCO, 1994.
- LOUDOT, C., R. GERARD, P. MORIN, I. GNINGUE. 1988. «Precise shipboard determination of dissolved oxygen (Winkler procedure) for productivity studies with a commercial system». *Limnol. Oceanogr.* 33: 146-150.

# Cuantificación de la producción primaria bruta mediante $^{18}\text{O}$ (GPP- $^{18}\text{O}$ )

<sup>1</sup>Delgado, A.; <sup>1</sup>Granados, A.; <sup>2</sup>Navarro, N.

<sup>1</sup>*Instituto Andaluz de Ciencias de la Tierra (CSIC)*

<sup>2</sup>*Universidad Rey Juan Carlos*

## Finalidad. Campo de aplicación

Calcular la producción bruta primaria (GPP) trazando el agua con agua enriquecida en el isótopo  $^{18}\text{O}$ .

## Conceptos generales

Este método se basa en marcar el agua con  $^{18}\text{O}$  de modo que podamos cuantificar el nuevo  $\text{O}_2$  producido durante la fotosíntesis que procede del agua. Por tanto, estamos midiendo la generación de oxígeno fotosintético producido durante el día, ya que por la noche solo se consume oxígeno (Grande et ál., 1982, 1991; Grande, 1988; Bender et ál., 1987).

## Equipamiento necesario

- Espectrómetro de masas de razones isotópicas (Delta Plus XP).
- GasBench: sistema para separación de gases que incluye una columna cromatográfica (molecular sieve 5A) de 25 m.

(Estos equipos por su tamaño y sensibilidad a los movimientos no es posible instalarlos en el barco).

- Incubadores de cubierta para las distintas profundidades.
- Refrigeradores de cubierta + bombas.
- Mallas de distinta transparencia.

## Reactivos y otro material fungible

- Viales con cierre hermético que impida cualquier permeabilidad de los gases.
- Agua marcada al 97% en  $^{18}\text{O}$ .
- Solución saturada en  $\text{HgCl}_2$ .

## Calibración

El gas de referencia es oxígeno (botellas de 50 litros de  $\text{O}_2$  99.999%, calidad C-50) que han sido calibradas con patrones internacionales facilitados por la IAEA y con aire atmosférico. También se utilizan botellas de aire sintético puro comercial (botellas de 50 litros) cuyos valores isotópicos de oxígeno han sido previamente calibrados con patrones internacionales (también sus razones  $\text{O}_2/\text{N}_2$  y  $\text{O}_2/\text{Ar}$ ). Además en cada serie de experimentos se toman “blancos” muestras con el mismo tratamiento pero sin oxígeno marcado, que son envenenadas con  $\text{HgCl}_2$  en el minuto cero.

## Descripción de la técnica

- En cada profundidad se llenan 6 viales de 12 ml (cuidando de que no quede ninguna burbuja de aire). Estos viales contienen una bolita de vidrio o teflón de modo que se facilite la agitación.
- 3 viales son envenenados inmediatamente con una solución saturada en  $\text{HgCl}_2$  (6,5%). Añadir en un vial  $\text{HgCl}_2$  en exceso de modo que una vez añadida el agua desionizada quede en el fondo siempre una cantidad de precipitado blanco sin disolver. También es posible usar una solución saturada al 50% ya que con la saturada se puede arrastrar el material sólido con la pipeta (o atascar la jeringa) si no se tiene cuidado. ATENCION: el cloruro de mercurio es muy toxico, usar guantes y lavar las manos después de su utilización) y almacenados en oscuridad (para este tamaño de vial, 10  $\mu\text{l}$  de solución saturada en  $\text{HgCl}_2$  son suficientes, se pueden añadir 25  $\mu\text{l}$  para estar más seguros). Agitar.
- 3 viales son marcados con  $\text{H}_2^{18}\text{O}$  (25  $\mu\text{l}$ ;  $\approx 2 \mu\text{l} / \text{ml}$ ) enriquecida al 98% en  $^{18}\text{O}$  de modo que el agua oceánica pase de tener un valor  $\mu^{18}\text{O}$  de  $\approx 0\text{‰}$  (V-SMOW) hasta alcanzar un valor comprendido entre +600‰ y +800‰ (V-SMOW). A estos viales se les añade una bolita de vidrio, agitar durante un minuto (no muy energéticamente ya que la bolita puede romper el vial).
- Para evitar una excesiva presión en el vial, y en instante previo de inyectar, ya sea la solución de  $\text{HgCl}_2$  o el agua enriquecida en  $^{18}\text{O}$ , es conveniente pinchar el vial con una jeringa hipodérmica (típicas de

un solo bloque de 1 ml con aguja muy fina 30G) de modo que al inyectar los 25 microlitros se evacue la misma cantidad de agua (o en su caso se libere la sobre presión que pueda tener el vial). La misma jeringa se puede usar para varios viales (se irá llenando paulatinamente). Cuando se termine de inyectar el agua marcada o el  $\text{HgCl}_2$ , es cuando se retira la jeringa de insulina y a continuación la otra jeringa (marcados o  $\text{HgCl}_2$ ).

- Las muestras a las que se les añadió el  $\text{H}_2^{18}\text{O}$  se incuban en cubierta durante 24 horas justas (Figura 1), para así evitar la difícil integración de horas de máxima luminosidad con las del atardecer. De este modo, se completa con más exactitud el ciclo diario. Debido a que el consumo de oxígeno durante la respiración produce un fraccionamiento isotópico despreciable, las horas nocturnas no afectarán a los cálculos de producción bruta primaria.
- Cuando termina el tiempo de exposición son envenenadas con  $\text{HgCl}_2$  para paralizar toda actividad biológica (sobre 1  $\mu\text{l}$  de solución saturada por cada mililitro).



Figura 1. Las muestras de cada profundidad se incuban en cubierta durante 24 horas ajustando, mediante filtros y sistemas de recirculación de agua a través de refrigeradores, las condiciones de luz y temperatura de cada profundidad.

- Después, ya en el laboratorio, se generará en cada vial un espacio de cabeza de 500  $\mu\text{l}$  con helio (evitando cualquier contaminación con oxígeno atmosférico). Se deja equilibrar durante 24 horas, de este modo se establece un equilibrio entre los gases disueltos en el agua y el espacio de cabeza (que originariamente era helio 100%) y que después contendrá una proporción de todos los gases que contiene el agua disueltos (incluido el  $\text{O}_2$ ). El oxígeno y argón se separa del

nitrógeno mediante columna cromatográfica (Révész et ál., 1999; Tobias et ál., 2007) y su razón isotópica se determinará en un espectrómetro de masas Delta Plus XP, ambos sistemas están conectados con un sistema de flujo continuo de He que arrastra a los gases objeto de estudio. El agua que se ha extraído para generar el espacio de cabeza (500  $\mu$ l) se usa para el análisis isotópico del oxígeno del agua (mediante el típico equilibrio  $\text{CO}_2$ -agua; Epstein y Mayeda, 1953).

### Cálculo de los resultados

La  $\text{GPP-}^{18}\text{O}$  se calcula a partir del valor isotópico obtenido en el  $\text{O}_2$  disuelto, siguiendo el procedimiento y ecuaciones usadas por Grande (1988), Dickson et ál. (2001) y Kiddon et ál. (1995). La desviación estándar (STD) está basada en propagación de errores asumiendo que los errores de las medidas son independientes.

$$\text{GPP} = \left[ \frac{(\delta^{18}\text{O}_f - \delta^{18}\text{O}_i)}{(\delta^{18}\text{O}_{\text{H}_2\text{O}} - \delta^{18}\text{O}_i)} - 1 \right] \times [\text{O}_2]_i$$

donde  $\delta^{18}\text{O}_i$  y  $\delta^{18}\text{O}_f$  son las medidas  $\delta^{18}\text{O}$  del oxígeno disuelto antes y después de la incubación, y  $\delta^{18}\text{O}_{\text{H}_2\text{O}}$  es la composición isotópica alcanzada por el oxígeno del agua tras ser marcada y  $[\text{O}_2]_i$  es la concentración de oxígeno disuelto antes de la incubación ( $\text{mmol O}_2 \text{ m}^{-3}$ ).

La  $\text{GPP-}^{18}\text{O}$  se complementará con el cálculo de la producción neta (NCP) de  $\text{O}_2$  a partir del cambio en las razones  $\text{O}_2/\text{Ar}$  antes y después de la incubación.

$$\text{Producción neta de } \text{O}_2 = [\text{O}_2]_i \frac{\left[ \frac{[\text{O}_2]_f}{[\text{Ar}]_f} - \frac{[\text{O}_2]_i}{[\text{Ar}]_i} \right]}{\frac{[\text{O}_2]_i}{[\text{Ar}]_i}}$$

Los subíndices “i” y “f” indica inicial y final

Para ello se analizarán las razones  $\text{O}_2/\text{N}_2$  y  $\text{O}_2/\text{Ar}$ , por lo que se necesita medir el  $\delta\text{O}_2/\text{N}_2$  (masas 32/28) y  $\delta\text{O}_2/\text{Ar}$  (masas 32/40). Cada medida se comparará (patrón interno) con aire sintético puro de composición conocida (Sowers et ál., 1989; Emerson et ál., 1991; Tobias et ál., 2007).

Por ejemplo,  $\delta\text{O}_2/\text{Ar}$  se expresa como:

$$\delta\text{O}_2/\text{Ar} = [(32/40)_{\text{muestra}} / (32/40)_{\text{aire}} - 1] \times 1000$$

Se necesitará tanto el  $\delta\text{O}_2/\text{Ar}$  inicial como el final.

## Referencias

- BENDER, M. L., K. GRANDE, K. JOHNSON, J. MARRA, P. WILLIAMS, J. SIEBURTH, M. PILSON, C. LANGDON, G. HITCHCOCK, J. ORCHARD, C. HUNT, P. DONAGHAY, K. HEINEMANN. 1987. «A comparison of four methods for the determination of planktonic community metabolism». *Limnol. Oceanogr.* 32: 1085-1098.
- EMERSON, S., P. QUAY, C. STUMP, D. WILBUR, M. KNOX. 1991. «O<sub>2</sub>, Ar, N<sub>2</sub> and <sup>222</sup>Rn in surface waters of the subarctic ocean: net biological O<sub>2</sub> production», *Glob. Biogeochem. Cyc.* 5: 49-69.
- EPSTEIN, S.; T. K. MAYEDA. 1953. «Variation of the <sup>18</sup>O/<sup>16</sup>O ratio in natural waters». *Geochim. Cosmochim. Acta.* 4: 213-224.
- GRANDE, K. D. 1988. «The use of the stable isotope, oxygen-18, as a tracer to measure gross primary production in coastal and oligotrophic waters and in monoclonal cultures of marine phytoplankton». Ph.D. thesis, University of Rhode Island, Kingston, RI, 214 pp.
- GRANDE, K. D., P. KROOPNIK, D. BURN, M. L. BENDER. 1982. «<sup>18</sup>O as a tracer of measuring of gross primary productivity in bottle experiments». *EOS* 63: 107.
- GRANDE, K. D., M. L. BENDER, B. IRWIN, T. PLATT. 1991. «A comparison of net and gross rates of oxygen production as a function of light intensity in some natural plankton populations and in a *Synechococcus* culture». *J. Plank. Res.* 13: 1-16.
- KIDDON, J., M. L. BENDER, J. MARRA. 1995. «Production and respiration in the 1989 North-Atlantic spring bloom: an analysis of irradiance-dependent changes». *Deep-Sea Res I* 42: 553-576.
- SOWERS, T., M. BENDER, D. RAYNAUD. 1989. «Elemental and isotopic composition of occluded O<sub>2</sub> and N<sub>2</sub> in polar ice». *J. Geophys. Res.* 94: 5137-5150.
- RÉVÉSZ, K., J. K. BÖHLKE, R. L. SMITH, T. YOSHINARI. 1999. «Stable isotope composition of dissolved O<sub>2</sub> undergoing respiration in a ground-water contamination gradient», en MORGANWALP, D. W. y BUXTON, H. T. (eds.), *U.S. Geological Survey Toxic Substances Hydrology Program-Proceedings of the Technical Meeting, Charleston, South Carolina, March 8-12, 1999*. U.S. Geological Survey Water-Resources Investigations Report 99-4018C, pp. 323-328.
- TOBIAS, C. R., J. K. BÖHLKE, J. W. HARVEY. 2007. «The oxygen-18 isotope approach for measuring aquatic metabolism in high-productivity waters». *Limnol. Oceanogr.* 52: 1439-1453.





# Determinación de la producción primaria fraccionada por tamaños

Cermeño, P.; Fernández, A.; Marañón, E.

*Universidad de Vigo*

## Finalidad. Campo de aplicación

La producción de carbono orgánico es una variable esencial para estudiar la fisiología de las poblaciones de fitoplancton marino, entender el funcionamiento ecológico de las comunidades planctónicas y cuantificar los flujos biogeoquímicos en el océano.

## Conceptos generales

El fitoplancton es el principal responsable de la producción primaria en el océano, realizando anualmente una fijación de carbono de unas 45 GtC, casi la mitad de la producción primaria global del planeta. La mayor parte de la producción primaria fitoplanctónica es reciclada dentro de la propia capa fótica a través de redes tróficas microbianas. Sin embargo, una fracción del carbono fijado fotosintéticamente es exportada hacia niveles tróficos superiores y el océano profundo, sustentando las pesquerías y contribuyendo a la retirada de CO<sub>2</sub> atmosférico. El reparto de la producción primaria en diferentes clases de tamaño de fitoplancton es una variable clave para comprender el destino del material fotosintetizado y determina en gran medida la estructura trófica de la comunidad planctónica y su capacidad para la exportación de carbono.

## Equipamiento necesario

Incubadores cilíndricos provistos de filtros azules y de densidad neutra conectados mediante un sistema de recirculación de agua a través de refri-

geradores (Figura 1). Micropipetas. Sistema de filtración en cascada (Figura 2). Bomba de vacío. Contador de centelleo líquido para medir la radiactividad de emisores beta.

### Reactivos u otro material fungible

Solución de  $\text{NaH}^{14}\text{CO}_3$ , botellas de incubación, filtros de polycarbonato, viales de centelleo de 4 ml, líquido de centelleo, HCl concentrado.

### Descripción de la técnica

*Preparación de la solución stock de  $\text{NaH}^{14}\text{CO}_3$ .* Utilizando agua milliQ llevada a  $\text{pH} \approx 10$  con  $\text{NaCO}_3$ , filtrada por  $0.2 \mu\text{m}$  y autoclavada, se diluye la solución original de  $\text{NaH}^{14}\text{CO}_3$  hasta obtener una concentración nominal de  $\approx 100 \mu\text{Ci/ml}$ .

*Recogida de muestras.* Las muestras se tomarán directamente de las botellas Niskin. Se tomarán muestras de 5 profundidades (superficie, DCM y 3 intermedias), preferiblemente al amanecer y con precaución para evitar la exposición de las células a luces intensas.

*Incubación.* Por cada profundidad se llenan con la muestra 4 botellas de polycarbonato tipo Corning (3 claras y 1 oscuras) de 75-250 ml de volumen, previamente lavadas con HCl (5%). Se inoculan con 100-200  $\mu\text{L}$  (10-20  $\mu\text{Ci}$ ) de la solución de  $^{14}\text{C}$  y se colocan en el incubador durante unas 12 horas (amanecer-anochece).

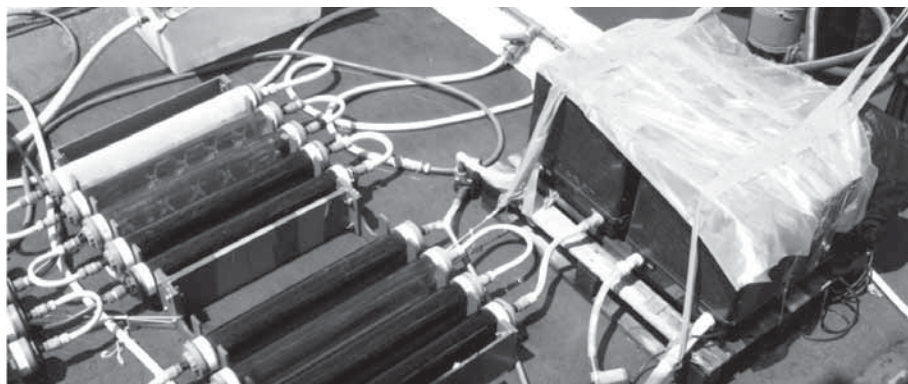


Figura 1. Incubadores de cubierta provistos de filtros azules y de densidad neutra y conectados mediante un sistema de recirculación de agua a través de refrigeradores.

*Filtración.* Tras terminar la incubación se filtra todo el volumen de las botellas a través de una serie de filtros de polycarbonato de tamaño de poro decreciente (20, 2 y 0.2  $\mu\text{m}$ ). Se empleará un sistema de copas de polycarbonato enroscables (Sartorius), que permite el acoplamiento de varios filtros en la misma torre (Figura 2). Se cuidará de que la presión de vacío sea baja (<100 mm Hg).

*Procesado de los filtros.* Para eliminar el  $^{14}\text{C}$  inorgánico retenido, los filtros se exponen a vapores de HCl concentrado durante 12 horas en la campana de gases del laboratorio de radiactividad. Luego, se colocan en viales de centelleo de 4 ml de capacidad y se añaden 3.5 ml de líquido

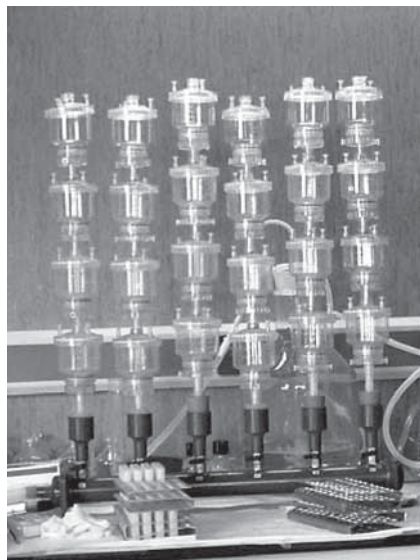


Figura 2. Sistema de filtración en cascada con copas de polycarbonato.

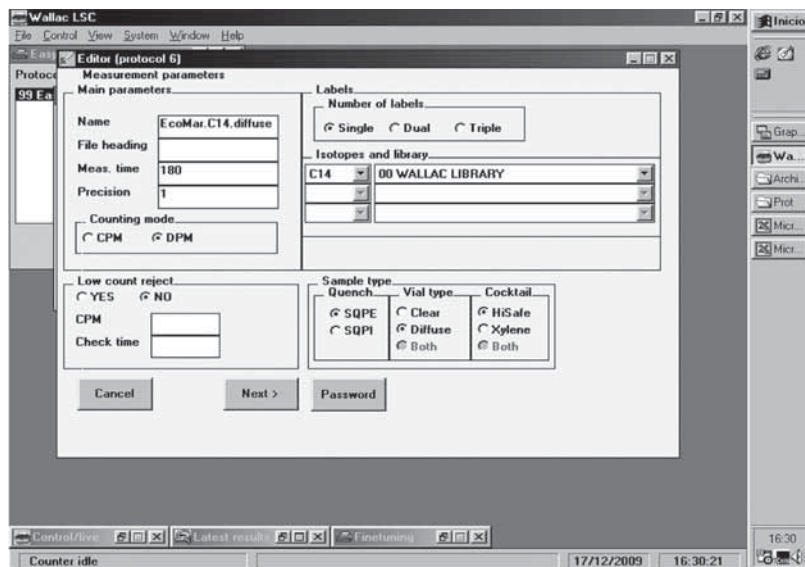


Figura 3. Captura de pantalla del monitor conectado al contador de partículas beta donde se muestran los dos criterios usados para determinar el tiempo de conteo de las muestras, tiempo máximo de medida (180 segundos en este caso) y umbral de error en la precisión de la medida (1%). El conteo se detiene en el momento en que se alcanza uno de estos criterios.

de centelleo. Las muestras se almacenan al menos durante 12 horas en oscuridad previamente a su medida en un contador de partículas beta (Figura 3). La Figura 4 muestra un esquema general de todo el procedimiento.

### Cálculo de los resultados

Para obtener la tasa de producción primaria particulada se tiene en cuenta la concentración de carbono inorgánico disuelto (CID) en el agua (25700  $\mu\text{g/L}$  si no hay datos reales), los DPMs añadidos y medidos y el tiempo de incubación. A la actividad de cada muestra se le resta el valor obtenido con la botella negra.

$$\text{Tasa de producción } (\mu\text{g C l}^{-1} \text{ d}^{-1}) = \text{CID } (\mu\text{g C l}^{-1}) * (\text{DPM}_{\text{muestra}} - \text{DPM}_{\text{negra}}) / \text{DPM}_{\text{añadidos}} * \text{tiempo incubación (1 día)}$$

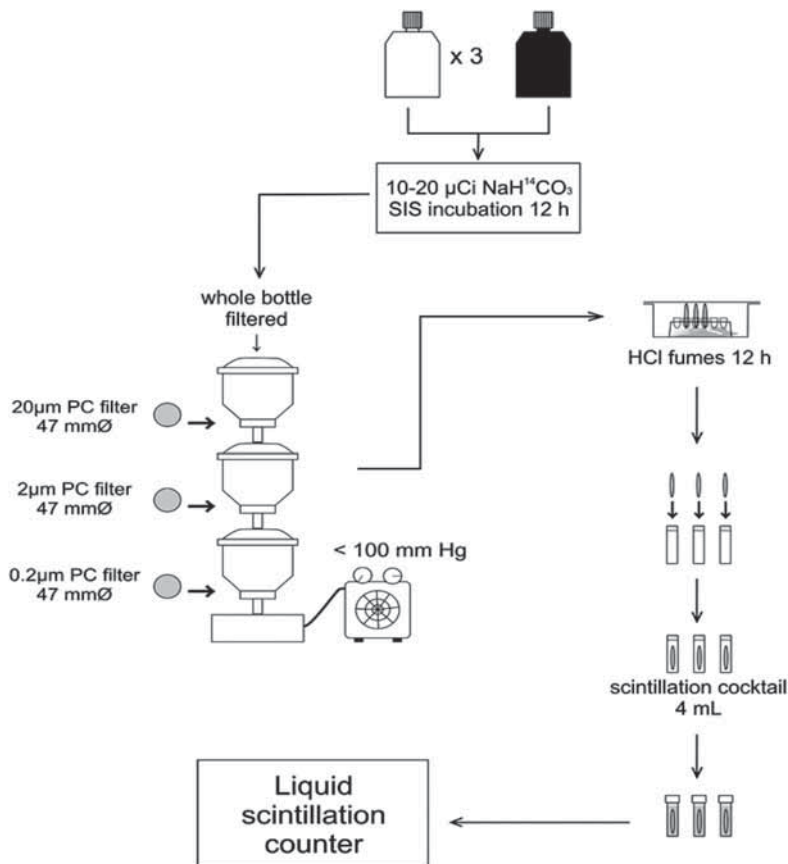


Figura 4. Esquema general que muestra los diferentes pasos a seguir para la determinación de la producción primaria fraccionada por tamaños.

## Referencias

- MARAÑÓN, E., P. M. HOLLIGAN, R. BARCIELA, N. GONZÁLEZ, B. MOURIÑO, M. J. PAZÓ, M. VARELA. 2001. «Patterns of phytoplankton size-structure and productivity in contrasting open ocean environments». *Mar. Ecol. Progr. Ser.* 216: 43-56.
- WILLIAMS, P. J. LE B., D. N. THOMAS, C. S. REYNOLDS (eds.). 2002. *Phytoplankton productivity. Carbon assimilation in marine and freshwater ecosystems*. Blackwell Science. Oxford.



# Determinación de la producción fotosintética de carbono orgánico disuelto

Cermeño, P.; Fernández, A.; Marañón, E.

*Universidad de Vigo*

## Conceptos generales

Parte de los productos recientes de la fotosíntesis realizada por el fitoplancton pueden ser liberados al medio en forma de materia orgánica disuelta, mediante diferentes mecanismos como la exudación o la lisis celular. La producción de carbono orgánico disuelto constituye de media entre un 10 y un 40% de la producción de carbono orgánico total del fitoplancton, por lo que su determinación es esencial para caracterizar la productividad marina.

## Finalidad. Campo de aplicación

La tasa de producción de carbono orgánico disuelto es una variable fundamental para estudiar la fisiología de las poblaciones de fitoplancton marino, entender el funcionamiento ecológico de las comunidades planctónicas y cuantificar los flujos biogeoquímicos en el océano.

## Equipamiento necesario

Incubadores cilíndricos provistos de filtros azules de densidad neutra y conectados mediante un sistema de recirculación de agua a través de refrigeradores. Micropipetas. Sistema de filtración circular con copas de acero y colectores inferiores para recoger los filtrados (Figura 1). Bomba de vacío. Contador de partículas beta.

## Descripción de la técnica

*Preparación de la solución stock de  $\text{NaH}^{14}\text{CO}_3$ .* Utilizando agua milliQ llevada a  $\text{pH} \approx 10$  con  $\text{NaCO}_3$  y autoclavada se diluye la solución original de  $\text{NaH}_4\text{CO}_3$  hasta obtener una concentración nominal de  $\approx 100 \mu\text{Ci/ml}$ .

*Recogida de muestras.* Las muestras se tomarán directamente de las botellas Niskin. Se tomarán muestras de 3 profundidades [superficie, DCM (1% PAR) y una profundidad intermedia que corresponda con el 20% de PAR], preferiblemente al amanecer y con precaución para evitar la exposición de las células a luces intensas.

*Incubación.* Por cada profundidad analizar se llenan con la muestra 4 botellas de polycarbonato tipo Corning (3 claras y 1 oscura), previamente lavadas con HCl (5%). Se inoculan con 150-200  $\mu\text{L}$  (15-20  $\mu\text{Ci}$ ) de la solución de  $^{14}\text{C}$  y se colocan en el incubador durante unas 12 horas (incubación amanecer-anochece). Se simularán las condiciones de luz y temperatura de la misma manera explicada para el caso de la producción primaria fraccionada por tamaños.

*Filtración.* Terminada la incubación se toma 1 submuestra de 5 ml de cada botella y se filtra a través de filtros de polycarbonato de 0.2  $\mu\text{m}$  de tamaño de poro, usando una presión de vacío muy baja (<50 mm Hg). El filtrado se recoge en viales de centelleo de plástico de 20 ml.

*Procesado de filtros y filtrados.* Los filtros se procesan de la misma forma descrita para la determinación de producción primaria particulada. A los filtrados, justo después de la filtración, se añaden 100-150  $\mu\text{L}$  de HCl 50%. Luego se dejan los viales abiertos en agitación orbital moderada durante toda la noche (Figura 2). Al día siguiente, se añade a cada vial 10 ml de líquido de centelleo Ultima Gold XR y se agita enérgicamente. Tras un reposo en oscuridad de unas 12-24 horas, la radiactividad en filtros y filtrados se mide en un contador de partículas beta.

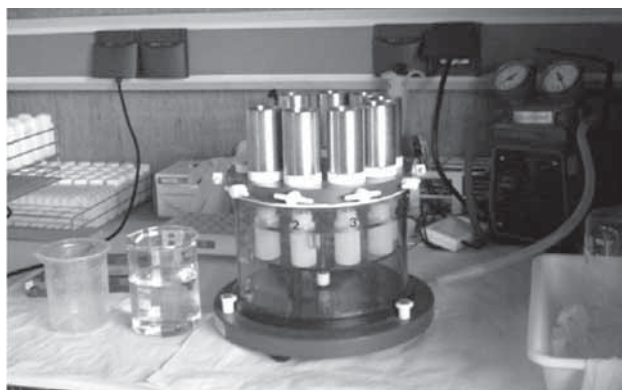


Figura 1. Rampa de filtración circular con copas de acero y colectores de filtrados en la parte inferior.



Figura 2. Agitador orbital usado en la eliminación de  $^{14}\text{C}$  de los filtrados, que se realiza en el interior de la campana de extracción de gases

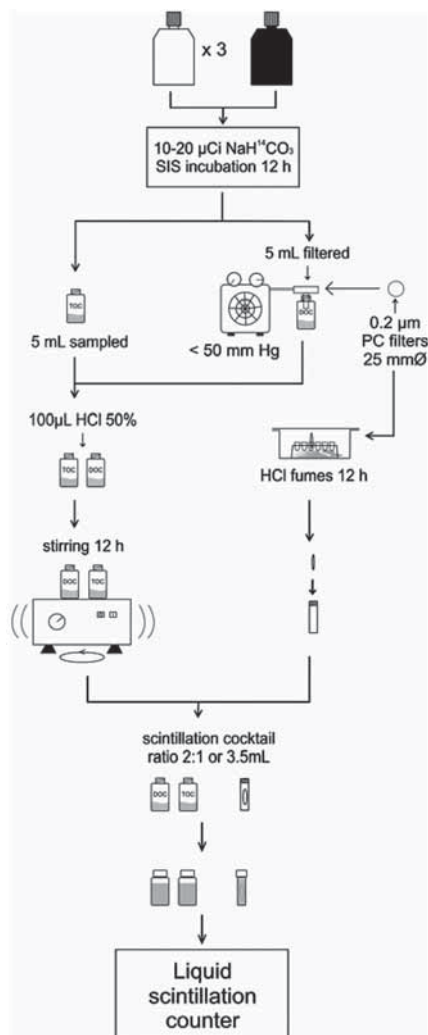


*Procesado de muestras para TOC.* En algunas estaciones y profundidades, de cada botella de incubación se toma una submuestra de 5 ml, se coloca directamente en un vial de centelleo de 20 ml y se procesa como si fuera un filtrado. Esta muestra permitirá determinar la producción total de carbono orgánico particulado y disuelto (TOC). La Figura 3 muestra un esquema general de todo el procedimiento.

### Reactivos u otro material fungible

Solución de  $\text{NaH}^{14}\text{CO}_3$ , botellas de incubación, filtros de policarbonato, viales de centelleo de 4 y 20 ml, líquido de centelleo, HCl concentrado.

Figura 3. Esquema del procedimiento para medir la producción fotosintética de carbono orgánico disuelto.



## Cálculo de los resultados

Para obtener las tasas de producción de COD se tiene en cuenta la concentración de CID en el agua (25700 µg/l si no hay datos reales), los DPMs añadidos y medidos, el tiempo de incubación y el volumen filtrado (5 ml) en relación al volumen total de la botella (72 ml). A la actividad de cada muestra se le resta la actividad medida en la botella negra.

Tasa de producción (µgC l<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>) = [Vol botella (ml) / Vol filtrado (ml)] \* CID (µg C l<sup>-1</sup>) \* (DPMmuestra – DPMnegra) / DPMañadidos \* tiempo incubación (1 día)

## Referencias

- MAGUE, T. H., E. FRIBERG, D. J. HUGHES, I. MORRIS. 1980. «Extracellular release of carbon by marine phytoplankton; a physiological approach». *Limnol. Oceanogr.* 25: 262-279.
- MARAÑÓN, E., P. CERMEÑO, E. FERNÁNDEZ, J. RODRÍGUEZ, L. ZABALA. 2004. «Significance and mechanisms of photosynthetic production of dissolved organic carbon in a coastal eutrophic ecosystem». *Limnol. Oceanogr.* 49: 1652-1666.

# Determinación de la producción primaria en presencia de radiación ultravioleta solar (UVR)

Sobrino, C.

*Universidad de Vigo*

## Conceptos generales

Parte de la radiación solar que alcanza la superficie terrestre penetra en el medio acuático donde es absorbida por el O<sub>2</sub>, la materia orgánica disuelta y por el agua (Smith y Baker, 1982). La radiación UV solar que alcanza la superficie terrestre (300-400 nm) también penetra en todos los ecosistemas acuáticos hasta profundidades dependientes de las características del agua. Una fracción de esta radiación UV puede ser absorbida por los organismos acuáticos. En los organismos autótrofos las dos dianas principales susceptibles de daño por exposición a radiación UV son los ácidos nucleicos y los componentes del aparato fotosintético. No obstante, la respuesta biológica depende de las características físicas y penetración de radiación UV en la columna de agua, y de la capacidad de reparación y/o presencia de sustancias fotoprotectoras presentes en el organismo (Vincent y Neale, 2000), entre otros factores.

## Finalidad. Campo de aplicación

A pesar de la importancia del efecto de la radiación UV sobre la inhibición de la fotosíntesis del fitoplancton marino, los estudios enfocados a la determinación de dicho efecto son escasos, quedando principalmente circunscritos a ecosistemas polares. Las consecuencias de la exposición a la radiación UV en los ecosistemas acuáticos incluyen un descenso en la fijación de CO<sub>2</sub>, con reducciones de hasta un 30% de la producción primaria integrada, cambios en la composición de especies y alteraciones en las cadenas tróficas.

## Equipamiento necesario

Dos incubadores cilíndricos transparentes a la radiación UV. Uno de ellos será forrado con filtro de acetato de celulosa transparente a la radiación visible y opaco a la radiación UV (UVO: Filtro Lee 226 UV. 95% de transmitancia a 700 nm y 50% transmitancia a 400 nm) (Figura 1). El otro se forrará con filtro de acetato de celulosa transparente a la radiación UV (UVT: Filtro Ultraphan 295. 95% de transmitancia a 700 nm y 50% transmitancia a 295 nm). Además, para la incubación y posterior procesamiento de las muestras se necesitarán botellas de Teflón-FEP, sistema de filtración (rampa, copas y bomba de vacío), y contador de centelleo líquido para medir la radiactividad de emisores beta.

## Descripción de la técnica

*Recogida de muestras.* Las muestras se tomarán directamente de la botella Niskin correspondiente a la profundidad de superficie, con precaución de evitar la exposición de las células a luces intensas. Se llenarán con la muestra 8 botellas de Teflón de 30 ml (3 claras y 1 oscura para cada tratamiento) previamente lavadas con HCl (5%).

*Incubación.* Todas las botellas se inocularán con 100  $\mu$ L (10  $\mu$ Ci) de la solución de  $^{14}$ C y se dejarán en el incubador hasta el anochecer. Adicionalmente, se llenarán 2 botellas de Teflón de 500 ml (una por tratamiento) que se incubarán en paralelo. Al final de la incubación, de cada una de estas botellas de 500 ml se filtrarán 2 réplicas de 250 ml para determinar la concentración final de clorofila *a* en las muestras expuestas a la radiación UV (tratamiento UVT) y en aquellas en las que se ha excluido la radiación UV (UVO).

*Filtración.* Terminada la incubación se filtrará toda la muestra a través de filtros de policarbonato (PC) de 0.2  $\mu$ m de tamaño de poro y 25 mm de diámetro, usando una presión de vacío baja (<100 mm Hg).

*Procesado de filtros.* Los filtros se colocarán extendidos en el fondo de un vial de vidrio en una gradilla que se colocará dentro de un recipiente con ácido clorhídrico concentrado durante 12 horas en la campana de

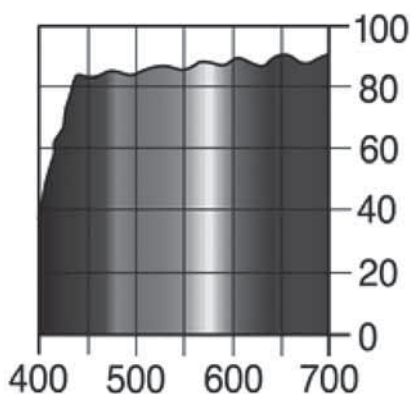


Figura 1. Espectro de transmitancia del filtro opaco a la radiación UV Lee 226 UV.

gases del laboratorio de radiactividad. Tras la eliminación del carbono no fijado, los filtros se colocarán en viales de centelleo de 4 ml de capacidad y se les añadirá 3.5 ml de líquido de centelleo. Las muestras se agitarán, asegurándonos que el líquido de centelleo adquiere un color transparente, previamente a su medida en un contador de partículas beta.

### Reactivos u otro material fungible

Solución de  $\text{NaH}^{14}\text{CO}_3$ , botellas de incubación de Teflón de 30 y 500 ml, filtros de policarbonato de 0.2  $\mu\text{m}$ , viales de centelleo de plástico de 20 ml, líquido de centelleo, ácido clorhídrico.

### Cálculo de los resultados

Para obtener la tasa de producción primaria particulada (POCp) se tiene en cuenta la concentración de carbono inorgánico disuelto (CID) en el agua (25700  $\mu\text{g/L}$  si no hay datos reales), los DPMs añadidos y medidos y el tiempo de incubación. En los casos en que se mide también DOCp y/o TOCp, hay que tener en cuenta la relación entre volumen (ml) de muestra incubado (Vinc) y volumen de muestra filtrado (Vfil). A la actividad de cada muestra se le resta el valor obtenido con la botella negra.

$$\text{POCp } (\mu\text{g C l}^{-1} \text{ d}^{-1}) = \text{CID } (\mu\text{g C l}^{-1}) * (\text{Vinc} / \text{Vfil}) / (\text{DPMmuestra} - \text{DPMnegra}) / \text{DPMañadidos} * \text{tiempo incubación (1 día)}$$

### Referencias

- SMITH, R. C.; K. S. BAKER. 1982. «Assessment of the influence of enhanced UV-B on marine primary productivity». En: J. CALKINS (ed.), *The role of solar ultraviolet radiation in marine ecosystems*. New York. Plenum Press, pp. 509-537.
- VINCENT, W. F.; P. J. NEALE. 2000. «Mechanisms of UV damage to aquatic organisms». En: S. J. DE MORA, S. DEMERS y M. VERNET (eds.), *The effects of UV radiation on marine ecosystems*. Cambridge Univ. Press, pp. 149-176.



## Determinación de la tasa de calcificación (PICp)

Marañón, E.

*Universidad de Vigo*

### Finalidad. Campo de aplicación

La calcificación es un importante proceso biogeoquímico, pues reduce la alcalinidad del agua, aumenta la  $p\text{CO}_2$  (afectando al intercambio de  $\text{CO}_2$  entre el océano y la atmósfera) y contribuye al transporte vertical de carbono hacia aguas profundas. La distribución global de la tasa de calcificación está poco conocida, y es susceptible de cambiar en el contexto actual de calentamiento y acidificación del océano.

### Conceptos generales

La calcificación biogénica, que consiste en la síntesis de  $\text{CaCO}_3$  a partir de carbono inorgánico disuelto, es realizada en el plancton por cocolitofóridos y foraminíferos. En la capa fótica, la tasa de calcificación suele representar <10% de la tasa de síntesis de carbono orgánico particulado. Este porcentaje se eleva cuando hay proliferaciones de cocolitofóridos.

### Equipamiento necesario

Incubadores cilíndricos provistos de filtros azules y de densidad neutra y conectados mediante un sistema de recirculación de agua a través de refrigeradores. Micropipetas. Sistema de filtración para filtros de 25 mm de diámetro con copas de 250 ml. Bomba de vacío. Agitador orbital. Contador de centelleo líquido para partículas beta.

## Descripción de la técnica

**Recogida de muestras.** Las muestras se tomarán directamente de las botellas Niskin. Se tomarán muestras de 3 profundidades (superficie, 20% y 1% PAR) con precaución para evitar la exposición de las células a luces intensas.

**Incubación.** Por cada profundidad se llenan con la muestra 4 botellas Corning (3 claras y 1 con formol) de ~250 ml, previamente lavadas con HCl (5%). La muestra con formol recibe, antes de inocular el  $^{14}\text{C}$ , 5 ml de solución de formol al 37-40%. Todas las botellas se inoculan con 300  $\mu\text{L}$  (30  $\mu\text{Ci}$ ) de la solución de  $^{14}\text{C}$  y se colocan en el incubador durante 24 horas, donde recibirán la luz incidente según el fotoperíodo natural.

**Filtración.** Terminada la incubación se filtra toda la muestra a través de filtros de policarbonato (PC) de 0.4  $\mu\text{m}$  de tamaño de poro y 25 mm de diámetro, usando una presión de vacío baja (<100 mm Hg).

**Procesado de filtros.** Los filtros se colocan extendidos en el fondo de un vial de vidrio, que luego se tapa con un septo de plástico al cual va fijado un cubilete que contiene un filtro GF/A plegado 2 veces sobre sí mismo y empapado con 200  $\mu\text{L}$  de feniletilamina (PEA). Tras cerrar los viales, con una jeringuilla se añade 1 ml de ácido fosfórico al 1%, con cuidado de que el ácido caiga sobre el filtro de PC y no toque el cubilete de plástico ni el filtro GF/A. Luego se dejan los viales en agitación orbital moderada durante 20-24 horas en la campana de gases. Después, se destapa el

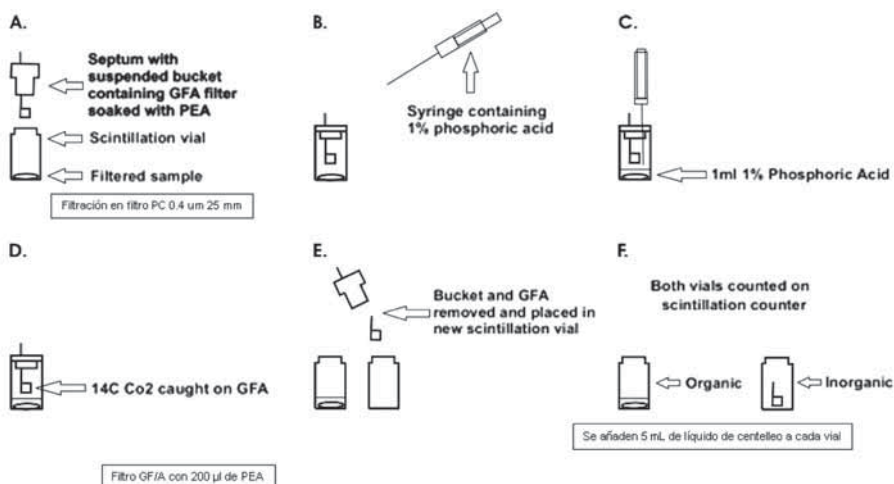


Figura 1. Técnica de la microdifusión para la medida de la tasa de calcificación. Esquema realizado por Alex Poulton (Southampton Oceanography Centre).



vial y con una tijera se corta el cubilete que contiene el filtro GF/A, de modo que caiga sobre un vial de plástico nuevo. En este vial que contiene el filtro GF/A se medirá la calcificación, mientras que en el vial que contiene el filtro de PC con el fosfórico se mide la fotosíntesis. A ambos viales se añaden 5 ml de líquido de centelleo, tras lo cual se dejan reposar en oscuridad durante unas 12-24 horas, antes de medir la radiactividad en un contador de partículas beta.

*Prueba de recuperación del  $^{14}\text{C}$ .* Al menos una vez al comienzo de cada campaña, se hace una prueba para comprobar la eficiencia con que la trampa de PEA atrapa el  $^{14}\text{C}$  inorgánico. Usando agua de mar filtrada y a partir de la solución stock de  $^{14}\text{C}$ , se prepara 1 ml de una solución con una actividad nominal de  $1\ \mu\text{Ci ml}^{-1}$  (dilución 1:100). Por triplicado, se añaden 10  $\mu\text{L}$  de esta solución (que contienen 0.1  $\mu\text{Ci}$ , es decir 226000 dpm) a viales en cuyo fondo se ha colocado un filtro PC de 0.4  $\mu\text{m}$ . A continuación se procesan estas muestras como se ha indicado anteriormente para comprobar cuánta de la radiactividad añadida es recuperada en el filtro GF/F empapado con PEA. El porcentaje de recuperación o eficiencia debe ser del 95-100%.

## Reactivos u otro material fungible

Solución de  $\text{NaH}^{14}\text{CO}_3$ , botellas de incubación de 250 ml, filtros de policarbonato de 0.4  $\mu\text{m}$ , filtros GF/A, viales de centelleo de vidrio y plástico de 20 ml, líquido de centelleo, ácido fosfórico 1%, formol 37-40%, feniletilamina.

## Cálculo de los resultados

Para obtener las tasas de calcificación (producción de PIC) se tiene en cuenta la concentración de CID en el agua (25700  $\mu\text{g/L}$  si no hay datos reales), los DPMs añadidos y medidos, el tiempo de incubación. A la actividad de cada muestra se le resta la actividad medida en la botella matada con formol.

$$\text{PICp } (\mu\text{gC l}^{-1} \text{ d}^{-1}) = \text{CID } (\mu\text{gC l}^{-1}) * (\text{DPM}_{\text{muestra}} - \text{DPM}_{\text{formol}}) / \text{DPM}_{\text{añadidos}} * \text{tiempo incubación (1 día)}$$

## Referencias

BALCH, W. M., K. KILPATRIK. 1996. «Calcification rates in the Equatorial Pacific along 140°W». *Deep Sea Res.* II 43: 971.

- PAASCHE, E., S. BRUBAK. 1994. «Enhanced calcification in the coccolithophorid *E. huxelyi* under P limitation». *Phycol.* 33: 324-330.
- POULTON, A. J., R. SANDERS, P. M. HOLLIGAN, M. C. STINCHCOMBE, T. R. ADEY, L. BROWN, K. CHAMBERLAIN. 2006. «Phytoplankton mineralization in the tropical and subtropical Atlantic Ocean». *Glob. Biogeochem. Cyc.* 20: GB4002.

# Tasas de lisis celular del fitoplancton

<sup>1,2</sup>Agustí, S.

<sup>1</sup>*Instituto Mediterráneo de Estudios Avanzados (UIB-CSIC)*

<sup>2</sup>*The UWA Oceans Institute and School of Plant Biology  
University of Western Australia*

## Finalidad. Campo de aplicación

El objetivo es cuantificar las tasas de pérdidas del fitoplancton debidas a la mortalidad celular. Se utilizará el método basado en la cuantificación de las esterases disueltas (Van Boeckel et ál. 1992), siguiendo el procedimiento descrito en Agustí et ál. (1998). Este método, es el único descrito hasta ahora que permite cuantificar las tasas de lisis en comunidades naturales de fitoplancton.

## Conceptos generales

El método se basa en la medida de la actividad esterasa disuelta en el agua como trazador de la lisis celular del fitoplancton, ya que las enzimas esterases son estrictamente citoplasmáticas, y aparecen en el medio tras la lisis celular o por daños a la membrana (e.g., Rotman y Papermaster, 1966). El método cuantifica la abundancia de la enzima disuelta en el agua cuantificando su actividad a 20 °C y en condiciones de saturación de sustrato. En presencia de fluoresceína di-acetato (FDA) que se añade como sustrato, las esterases rompen el acetato y se libera el compuesto fluorescente Fluoresceína. La fluoresceína se acumula en las muestras como producto de la reacción entre la actividad esterasa y la FDA y aumenta al aumentar la concentración de FDA siguiendo la cinética enzimática de Michaelis-Menten (Rotman y Papermaster, 1966).

## Equipamiento necesario

- Baño seco.
- Pipeta automática volumen variable 1-5 ml.
- Pipeta multidispensadora.
- Vórtex.
- Espectrofluorímetro.

## Reactivos u otro material fungible

### Reactivos.-

- Solución 2 mM de FDA (fluoresceína-di-acetato, 0.0416 gr en 50 ml Acetona 100%) Solución 20 mM de EDTA (0.3724 gr en 50 ml agua destilada).
- Fluoresceína, para calibración (ALDRICH ref# 16.630-8, MW = 376.28).
- Soluciones I, II y III del medio F/2.
- Ácido clorhídrico para lavado.

### Material Fungible.-

- Pipetas Pasteur.
- Jeringas y Millex 0.2  $\mu\text{m}$ .
- Tubos 15 ml (100).
- Gradillas.
- Botes vidrio 1 l (2) y 250 ml (4).
- Cubetas 1 cm todos los lados claros.

## Calibración

La actividad esterasa disuelta se cuantifica como la concentración de fluoresceína liberada en las muestras por unidad de tiempo (a 20 °C, y durante una hora de incubación en nuestro caso). Se prepara una solución estándar de fluoresceína que debe medirse en el espectrofluorímetro tras cada serie de medidas. El estándar de fluoresceína se prepara en agua destilada en concentraciones de 10 nM a 1000 nM. El estándar a oscuras y refrigerado es estable durante meses.

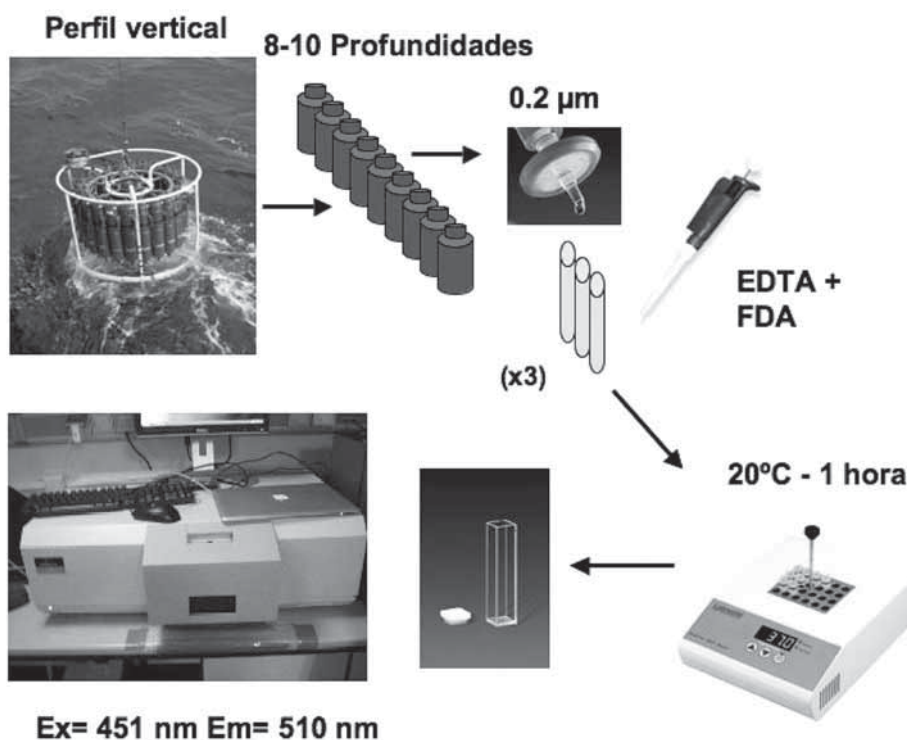
## Descripción de la técnica

Se cuantificará en perfiles verticales en la columna de agua desde la superficie hasta los 150-200 m de profundidad en todas las estaciones coincidiendo con las profundidades de medida de picofitoplancton y clorofila

por fluorometría. Se tomarán 50 ml de agua de las botellas Niskin de cada profundidad en botes oscuros lavados al ácido. Con el fin de realizar un blanco de reactivos, se muestreará regularmente (al menos 2 veces en cada leg) 50 ml de una profundidad > 2000 m, libre de esterasas disueltas en la que se analizara la DEA y se tomara como blanco de referencia.

Inmediatamente después del muestreo, tomar un volumen de agua de cada profundidad muestreada con la jeringa y filtrar por  $0.2\ \mu\text{m}$  utilizando un Millex para medir la actividad esterasa disuelta (DEA). Distribuir 5 ml del agua de mar filtrada por triplicado en tubos de vidrio. Añadir  $50\ \mu\text{L}$  de EDTA y  $50\ \mu\text{L}$  de FDA a cada tubo con la pipeta multidispensadora. Agitar en un vórtex e incubar en un baño a  $20\ ^\circ\text{C}$  durante exactamente una hora. Pasado este tiempo, medir inmediatamente la fluorescencia en un espectrofluorímetro a  $451\ \text{nm}$  de excitación y a  $510\ \text{nm}$  de emisión. Las esterasas particuladas (PEA) se derivaran de la concentración de clorofila *a*, utilizando los cocientes PEA/Chl*a* publicados por Agustí y Duarte (2002).

### Cuadro sinóptico de la técnica



## Cálculo de los resultados

*Tasas de decay de la DEA.* Se realizarán medidas de la pérdida de actividad de la enzima ( $> 4$  en cada leg). Las enzimas una vez liberadas al medio tras la lisis pierden actividad por diversas causas (químicas y biológicas). Las medidas consistirán en añadir esterases disueltas, derivadas de un cultivo de fitoplancton que se mantendrá a bordo añadiendo medio de cultivo f/2 al agua de mar, a muestras de agua de 250 ml de la superficie y del DCM que se incuban a temperatura in situ. Se cuantificará la pérdida de actividad (DEA) de cada muestra a intervalos de tiempo creciente (0, 1, 3, 6, 12, y 24 h) para obtener una curva de pérdida de actividad exponencial, aplicando la ecuación descrita en Agustí et ál. (1998).

*Cálculo de las tasas de lisis del fitoplancton.* Se calcularán para cada profundidad a partir de los valores de DEA, PEA y tasa de pérdida de actividad, según se describe en Agustí et ál. (1998).

La tasa de lisis del fitoplancton ( $\mu\text{L d}^{-1}$ ) se calcula como la disminución en la actividad esterasa particulada (PEA) con el tiempo (t), debido a la producción de esterases disueltas durante la lisis celular, siguiendo la ecuación:

$$\mu_L (\text{d}^{-1}) = \frac{\text{Ln} \left( \frac{\text{PEA}_t}{\text{PEA}_0} \right)}{t} \quad (1)$$

donde  $\text{PEA}_0$  es la Actividad de esterasa particuladas en el tiempo inicial, y  $\text{PEA}_t$  después del tiempo t, siendo t igual a un día.

La tasa a la que la actividad esterasa (EA) desaparece una vez excretada al medio (experimentos de desaparición de la actividad de la enzima), se calcula en base a los cambios en EA disuelta en un tiempo t (horas),

$$\mu(\text{loss})_{\text{EA}} (\text{h}^{-1}) = \frac{\text{Ln} \left( \frac{\text{EA}_0}{\text{EA}_t} \right)}{t} \quad (2)$$

$\mu(\text{loss})_{\text{EA}}$  se utiliza para calcular la vida media ( $T_{1/2}$ ) de la DEA en el agua de mar (ecuación 3),

$$T_{1/2} (\text{h}) = \text{Ln}(0.5) / \mu(\text{loss})_{\text{EA}} \quad (3)$$

La producción de esterases disueltas (EA (Prod.)) en un día se calcula a partir de la vida media

$$\text{EA}_{(\text{Prod.})} \text{ d}^{-1} = \frac{\frac{1}{2} \text{ EA}}{T_{(1/2)}} \quad (4)$$

y la tasa de lisis del fitoplancton ( $\mu\text{L}$ ) se calcula, usando Ec. (1), reemplazando  $\text{PEA}_t$  por  $\text{PEA}_0 - \text{EA}(\text{Prod.})$

$$\mu_L \text{ (d}^{-1}\text{)} = \text{Ln} \left( \frac{\text{PEA}_0 - \text{EA}_{(\text{Prod.})}}{\text{PEA}_0} \right) \quad (5)$$

Se asume que la tasa de desaparición de la enzima disuelta está en estado estacionario a una escala de horas, es decir, que la pérdida de la enzima y su producción están en equilibrio (ej. Agustí et ál. 1998).

## Control de calidad

Los valores mínimos de blanco de referencia (fluorescencia de reactivos) para DEA publicados correspondientes a agua profunda (500 m) del océano Atlántico son de  $15.2 \pm 0.6$  nmol fluoresceína  $\text{L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ . Los valores obtenidos por tanto deben ser superiores a este valor de referencia.

## Referencias

- AGUSTÍ, S., M. P. SATTÀ, M. P. MURA, E. BENAVENT. 1998. «Dissolved esterase activity as tracer of phytoplankton lysis: Evidence of high phytoplankton lysis rates in the NW Mediterranean». *Limnol. Oceanogr.* 43: 1836-1849.
- AGUSTÍ, S., C. M. DUARTE. 2002. «Addressing uncertainties in the assessment of phytoplankton lysis rates in the sea». *Limnol. Oceanogr.* 47: 921-924.
- ROTMAN, B., B. W. PAPERMASTER. 1966. «Membrane properties of living mammalian cells as studied by enzymatic hydrolysis of fluorogenic esters». *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 55: 134-141.
- VAN BOEKEL, W. H. M., F. C. HANSEN, R. RIEGMAN, R. P. M. BACK. 1992. «Lysis-induced decline of a phaeocystis spring bloom and coupling with the microbial foodweb». *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 81: 269-276.





# Estimación de la tasa bruta de crecimiento del pico-fitoplancton mediante análisis del índice mitótico

<sup>1,2</sup>Agustí, S.; <sup>1</sup>Cerezo, M. I.

<sup>1</sup>*Instituto Mediterráneo de Estudios Avanzados (UIB-CSIC)*

<sup>2</sup>*The UWA Oceans Institute and School of Plant Biology  
University of Western Australia*

## Finalidad. Campo de aplicación

Cuantificación de las tasas de crecimiento del fitoplancton mediante el análisis de división celular aplicando el método del índice mitótico. El método permite cuantificar la tasa bruta de crecimiento.

## Conceptos generales

El crecimiento y la división celular del pico-fitoplancton (células  $\leq 2$   $\mu\text{m}$  diámetro) que domina el océano oligotrófico (ej. Agawin et ál. 1998) están sincronizadas en la naturaleza con el ciclo día-noche (Liu et ál. 1998, Vaultot y Marie, 1999).

## Equipamiento necesario

- Sistema de incubación.
- Tanque.
- Enfriador de cubierta.
- Botellas de 2 L.
- Colector de fracciones Gilson.
- Bomba peristáltica.
- Congelador -80 °C.
- Vórtex.
- Citómetro de Flujo.

## Reactivos u otro material fungible

### Reactivos:

- Glutaraldehido (1% concentración final en la muestra).
- SYBR-GREEN I (Molecular Probes).
- RNase A (Sigma R-4875), preparada en solución 1:1 (wt/wt 1-1).
- RNase B (Sigma R-5750), preparada en solución 1:1 (wt/wt 1-1).
- Citrato potásico (concentración final de 25 mM).
- ClH (para lavado).
- Tubos targon (30 m).
- Tubos cónicos 15 ml.
- Crioviales 2 ml.
- Pipeta automática 1000-5000  $\mu$ l.
- Pipeta automática 100-1000  $\mu$ l.
- Pipeta automática 10-100  $\mu$ l.

## Calibración

No se realiza, se utilizan los valores arbitrarios de fluorescencia verde por célula obtenidos en el citómetro de flujo.

## Descripción de la técnica

La cuantificación de la tasa de crecimiento de las poblaciones de pico-cianobacterias se estimará mediante el análisis de su ciclo de división celular. Se analizarán con preferencia tasas en poblaciones superficiales, aunque es probable que se incluyan también estimas de otras profundidades. Si el ciclo no se sigue in situ, con muestreos regulares en la posición de muestreo, se puede incubar la muestra reproduciendo las condiciones naturales de temperatura e iluminación. En este caso, se puede experimentar para conocer el efecto de distintas condiciones de crecimiento sobre la tasa de división de los organismos.

### *Incubación y ejemplos de experimentación.*

Experimentos con variación de temperatura: 2-L de agua de superficie se dispensan por duplicado en botellas de 2-L PC Nalgene bottles lavadas al ácido. Las botellas se incubarán durante 24 horas en cubierta, y expuestas a iluminación solar natural en un tanque con un circuito de agua de superficie para mantener la temperatura igual a la de superficie. Otras botellas se incuban en un tanque sometidas a un incremento de temperatura de

2-3 °C p.e. con respecto a la que hay en superficie, utilizando un sistema de refrigeración y termostatos para controlar la temperatura y expuestas a radiación solar natural para conocer como la temperatura afecta a las tasas brutas de crecimiento del pico-fitoplancton.

**Experimentos con adición de Hidrocarburos Policíclicos Aromáticos:** En la Expedición Malaspina-2010 se utilizó esta técnica para conocer el efecto de contaminantes orgánicos, sobre el ciclo de división del picofitoplancton. Para ello se dispensaron 2 l de agua por triplicado en botellas de policarbonato de 2l de volumen, lavadas previamente con ácido y acetona diluida al 90% (para eliminar cualquier residuo de hidrocarburo). A las botellas se les añadió hidrocarburos, en una mezcla compleja de 16 PAHs (Fluoreno, Phenantreno, Anthraceno, Pyreno, cryseno, benzo (a) anthraceno, benzo (b) fluoranthreno, benzo (k) fluoranthreno, benzo (a) pireno, dibenzo (a,h) anthraceno y benzo (ghi) peryleno). Las concentraciones añadidas representan una concentración mayor a la que hay en el océano; las concentraciones añadidas variaron entre 0,2 µg/l, 0,5 µg/l, 0,8 µg/l, 1 µg/l, 1,3 µg/l, 1,5 µg/l, 2 µg/l y 2,5 µg/l. Las botellas se incubaron durante 24h en un tanque en cubierta expuesto a luz solar natural, con un circuito de agua de superficie, con el objetivo de mantener la temperatura in situ.

#### **Muestreo:**

Cada 2 horas las poblaciones se muestrean utilizando un sistema de muestreador automático programable; las submuestras se fijan con glutaraldehído (1% concentración final), se introducen en nitrógeno líquido durante un tiempo suficiente para que queden congeladas y se mantendrán guardadas a -80 °C hasta su análisis en un citómetro de flujo (Agawin y Agustí, 2005).

**Análisis.** Las muestras se descongelan a temperatura ambiente y se incuban a 37 °C durante 30 minutos en presencia de 0.1 g l<sup>-1</sup> de solución RNase A y B, para eliminar RNA y ácidos nucleicos ribosómicos. Posteriormente, se añade citrato potásico (concentración final de 25 mM) y SYBR-GREEN I (concentración final de 10<sup>-4</sup> de la solución comercial) para tinción del ADN y se incuba durante más de 15 minutos a temperatura ambiente en oscuridad antes de su análisis por citometría de flujo (Marie et ál. 1997). La adquisición logarítmica o linear en el citómetro de flujo debe hacerse en función del modelo que se utilice (FACSCalibur o FACSARIA) con el análisis de los datos del ciclo en modo linear. Los valores de fluorescencia verde por célula, son equivalentes a la concentración de ADN celular, aumentando en 2 veces en forma linear en la fase G2-M con respecto a la fase G1. Las poblaciones de *Synechococcus* y *Prochlorococcus* se identifican en función de sus señales de scattering (SSC), y fluorescencias roja y naranja como se describe en la ficha de contajes de picofitoplancton mediante citometría de flujo.

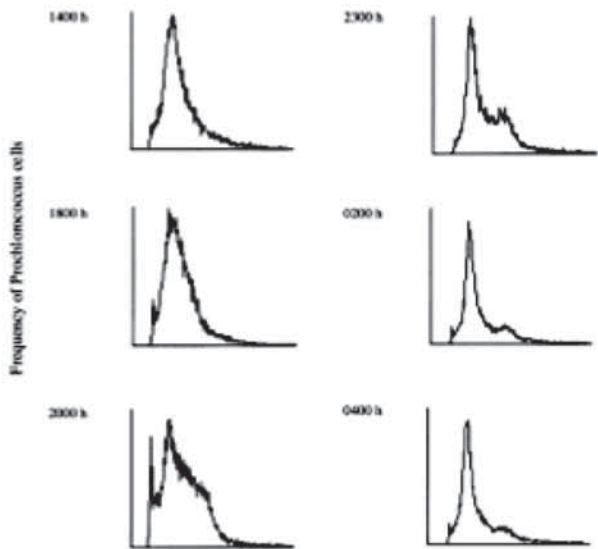
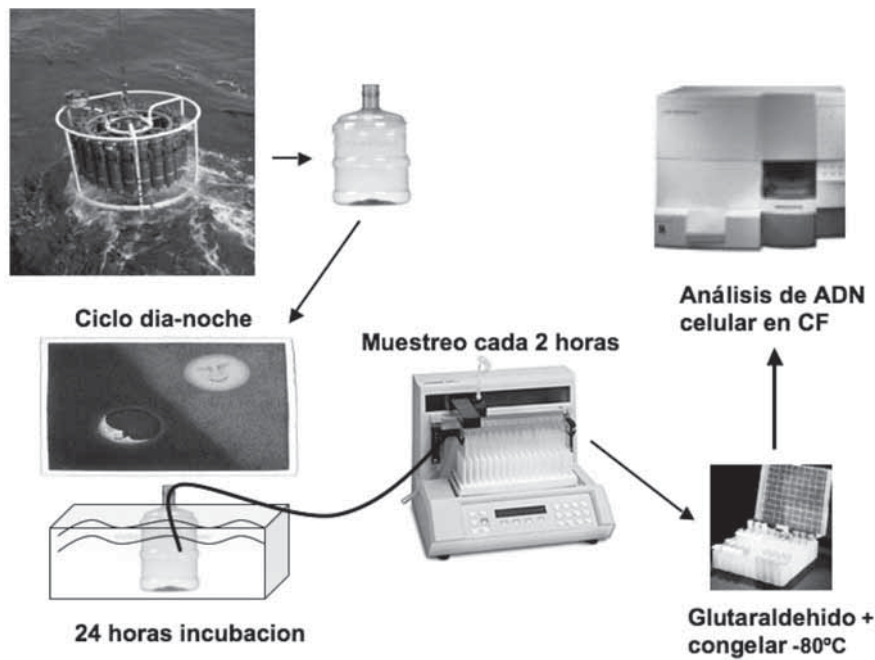


Figura 1. Fluorescencia verde de células de *Prochlorococcus* con ADN teñido con SYBR-green1, y los cambios observados durante el ciclo día-noche (Agawin y Agustí, 2005).

Cuadro sinóptico de la técnica



## Cálculo de los resultados

Para el análisis del ciclo celular se utilizará el programa ModFit LT (Verity Software House, Inc. 1995) o un *software* similar, para estimar los porcentajes de células en las fases G1, G2-M, y S.

## Estimas de las tasas de crecimiento

Las tasas medias de crecimiento específico de las distintas poblaciones se calcularán siguiendo el método de Liu et ál. (1997):

$$\mu = \frac{1}{(T_s + T_{G2M})} \int_0^{24} \ln[1 + f_s(t) + f_{G2M}(t)] dt$$

donde  $\mu$  es la tasa de crecimiento,  $T_s + T_{G2M}$  es la duración de la mitosis estimada gráficamente como el log temporal entre la fase S (fracción máxima) y la fase G2+M (fracción máxima), multiplicado este tiempo por 2 (Carpenter y Chang 1988).  $f_s(t_i)$  y  $f_{G2M}(t_i)$  son las fracciones de las células en S y G2+M en cada intervalo de muestreo.

## Control de calidad

Los resultados son fiables, indicando que la tinción del ADN y detección de las fases de síntesis y mitosis está siendo óptima, cuando el aumento en la fluorescencia de las células en la fase G2-M con respecto a la fluorescencia en la fase G1, es de  $2 \pm 0.5$  veces.

## Referencias

- AGAWIN, N. S., C. M. DUARTE, S. AGUSTÍ. 1998. «Growth and abundance of *Synechococcus* sp. in a Mediterranean Bay: Seasonality and relationship with temperature». *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 170: 45-53.
- AGAWIN N. S. R., S. AGUSTÍ. 2005. «*Prochlorococcus* and *Synechococcus* cells in the Central Atlantic Ocean: distribution, growth and mortality grazing rates». *Vie et Milieu*. 55: 165-175. Pico-phytoplankton Special Issue.
- LIU H., M. R. LANDRY, D. VAULOT, L. CAMPBELL. 1999. «*Prochlorococcus* growth rates in the central equatorial Pacific: An application of the fmax approach». *J. Geophys. Res.* 104: 3391-3399.
- MARIE D., F. PARTENSKY, S. JACQUET, D. VAULOT. 1997. «Enumeration and cell cycle Analysis of natural populations of marine picoplankton by flow cytometry using the nucleic acid stain SYBR Green I». *Appl. Envir. Microbiol.* 63: 186-193.
- VAULOT D., D. MARIE. 1999. «Diel variability of photosynthetic picoplankton in the equatorial Pacific». *J. Geophys. Res.* 104: 3297-3310.



# Toxicidad de contaminantes orgánicos para las poblaciones de fitoplancton oceánico

<sup>1</sup>Cerezo Sánchez, M. I.; <sup>1,2</sup>Agustí, S.

<sup>1</sup>*Instituto Mediterráneo de Estudios Avanzados (UIB-CSIC)*

<sup>2</sup>*The UWA Oceans Institute and School of Plant Biology  
University of Western Australia*

## Finalidad. Campo de aplicación

Con este método lo que se pretende es estudiar el efecto de los contaminantes sobre el fitoplancton; el objetivo es calcular el valor de LC50 y LC10 (concentración de contaminante con la que la población de fitoplancton se ve reducida un 50% o 10% respectivamente) para conocer la toxicidad de una mezcla compleja de Hidrocarburos Policíclicos Aromáticos sobre las comunidades de fitoplancton.

## Conceptos generales

Los contaminantes orgánicos persistentes (COP) llegan a los océanos tras recorrer largas distancias a través del transporte atmosférico. Una vez en el agua se incorporan a los organismos planctónicos. Se ha demostrado que las cadenas alimentarias oceánicas influyen en el ciclo de los contaminantes orgánicos persistentes a escala regional y global (Dachs et ál. 2002; Lohmann et ál. 2007; Jurado y Dachs, 2008). La síntesis y uso de gran cantidad de compuestos sintéticos en diferentes aplicaciones industriales y domésticas (Muir y Howard, 2006), contribuye a perturbar la composición química de la biosfera (Lohmann et ál. 2007, Dachs y Mejanelle, 2010). Las mezclas complejas de contaminantes orgánicos tienen un efecto toxico importante sobre las abundancias de fitoplancton, su viabilidad y concentración de clorofila a. La toxicidad de las mezclas complejas de Hidrocarburos es mucho mayor a la suma de la toxicidad de cada compuesto de la mezcla

por separado (Echeveste et ál. 2010). Las comunidades de fitoplancton se ven fuertemente afectadas por la presencia de concentraciones elevadas de hidrocarburos policíclicos aromáticos, siendo mayor su disminución poblacional cuanto mayor es la concentración de contaminantes orgánicos (Echeveste et ál. 2010).

### **Equipamiento necesario**

- Tanque y sistema de incubación en la cubierta del barco.
- Botellas de 500 ml de cuarzo.
- Congelador -80 °C.
- Vórtex.
- Citómetro de Flujo.
- Baño seco.
- Fluorómetro Turner Designs.
- Rampa y soportes de filtración.
- Bomba de vacío.
- Bomba de agua.
- Bomba peristáltica.

### **Reactivos u otro material fungible**

- Reactivos:
- Acetona 90%.
- Glutaraldehído (1% en muestra).
- Ácido clorhídrico (para lavar).
- Acetona (para lavar).
- Solución de Beads fluorescentes -1  $\mu\text{m}$  diámetro (capítulo citometría).
- Solución DNasa I, 400 $\mu\text{g/ml}$  en HBSS.
- Solución de tripsina, 1%.
- Yoduro de propidio (1 ml/ml).
- SyBR Green 1:100 concentración.

### **Fungible:**

- Tubos Falcon.
- Gradillas.
- Dispensador Glutaraldehído.
- Tubos centrífuga.
- Cubetas de fluorómetro.
- Filtros Whatman 25 mm.
- Acetona 90%.



- Dispensador de acetona.
- Crioviales 2 ml.
- Pipeta automática 1000-5000  $\mu\text{l}$ .
- Pipeta automática 100-1000  $\mu\text{l}$ .
- Pipeta automática 10-100  $\mu\text{l}$ .
- Tubos de citómetro.
- Portas de cristal para microscopía.
- Matraces de cuarzo de 500 ml de volumen.

### Descripción de la técnica

El análisis del efecto de las mezclas de Hidrocarburos Policíclicos Aromáticos sobre las comunidades fitoplanctónicas, se realiza mediante la exposición de comunidades naturales a mezclas complejas de PAHs (Fluoreno, Phenantreno, Anthraceno, Pyreno, cryseno, benzo (a) anthraceno, benzo (b) fluoranthreno, benzo (k) fluoranthreno, benzo (a) pireno, dibenzo (a,h) anthraceno y benzo (ghi) peryleno), realizadas en el laboratorio o naturales, durante un periodo de tiempo suficiente que permita observar un efecto importante sobre la abundancia y viabilidad de las comunidades de *Prochlorococcus*, *Synechococcus* y eucariotas.

### Muestreo e incubación

Se utiliza agua de superficie para realizar los experimentos, para ello debe extraerse mediante una botella Niskin y distribuirla en matraces de cuarzo de 500 ml, previamente limpiadas con ácido clorhídrico y acetona.

Antes de añadir el agua, se debe añadir el volumen deseado de la mezcla de contaminantes en cada botella y se deja evaporar la acetona durante 1 h para evitar la presencia del solvente en los tratamientos. Cada muestra de agua recibe una concentración diferente de la mezcla de PAHs que representa 5, 10, 50, 100 y 500 veces la concentración real en el agua de mar. Para cada tratamiento se tiene una botella por duplicado a modo de réplica. Junto con los tratamientos de contaminantes se deben poner dos botellas sin adición de la mezcla de PAHs, a modo de control.

Las botellas de cuarzo se deben incubar en la cubierta del barco, en condiciones naturales de radiación solar, dentro de un tanque alimentado por un sistema agua de mar en continuo, lo que permite mantener las condiciones de temperatura in situ. Cada botella debe estar cubierta con una red neutral para simular las condiciones de luz de 3-5 m de profundi-

dad. El muestreo de las botellas se realiza cada 24 h para todas las botellas durante 7 días (o hasta que la abundancia de las poblaciones de fitoplancton sea muy baja).

### *Análisis*

Se realizan diferentes análisis de cada botella.

**CLOROFILA:** se toman 4 réplicas (200ml x 4) de la muestra de agua inicial (del botellón). Posteriormente se toma una muestra de 50ml cada 48h para su análisis, El método a seguir es el descrito en la ficha “Determinación fluorimétrica de la concentración de clorofila *a*”.

**NADS (Tinción del doble ácido nucleico):** cada día se toman dos muestras de 0.5 ml para realizar el análisis de las bacterias vivas y muertas por citometría de flujo. El método consiste en realizar una tinción mediante la utilización de yoduro de propidio y SyBRGreen en oscuridad.

El ensayo de la tinción del ácido nucleico doble, basado en citometría de flujo, permite distinguir las bacterias viables (Gregori et ál. 2001).

El yoduro de propidio penetra en la membrana dañada o permeable de las bacterias y el SyBRGreen tiñe todas las bacterias, lo que permite diferenciar en citometría de flujo las vivas y muertas.

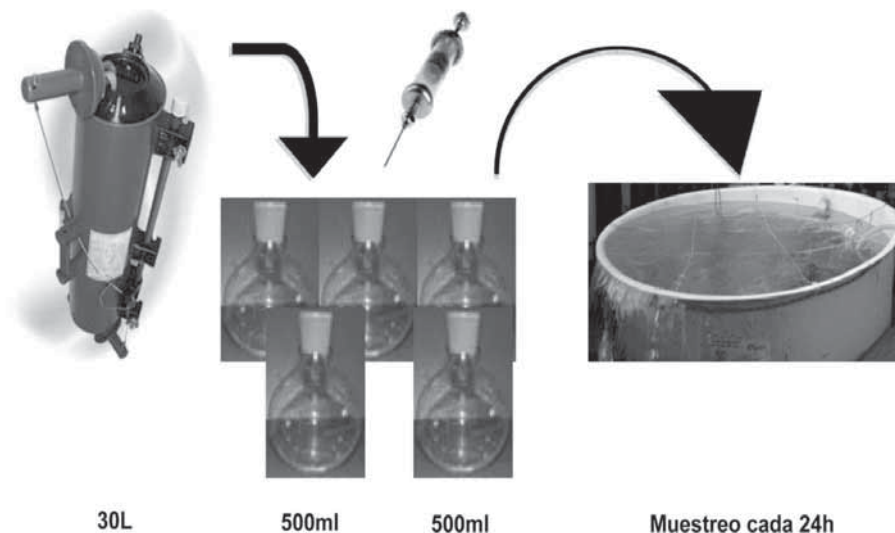
Para cada ml de muestra se debe:

- añadir 10 µL de yoduro de propidio.
- Incubar durante 30 min en condiciones de oscuridad a temperatura ambiente.
- Posteriormente añadir 10 µL de SyBRGreen e incubar durante 10min a temperatura ambiente en condiciones de oscuridad.
- Por último, analizar las muestras por citometría de flujo.

Para el análisis de los datos se aplica el protocolo para recuentos de bacterias por citometría de flujo.

**ABUNDANCIA DE FITOPLANCTON:** cada día se toman 0.5 ml de cada botella por duplicado; mediante citometría de flujo se analiza la abundancia de *Prochlorococcus*, *Synechococcus* y eucariotas, siguiendo el método descrito en la ficha “Cuantificación de la abundancia de células vivas y muertas de las comunidades de picoplancton”.

### Cuadro sinóptico de la técnica



### Cálculo de los resultados

Se calculan los umbrales letales de 50% (LC50) y del 10% (LC10) a partir de los datos de abundancia de picoplancton. Estos datos indican la concentración de contaminantes en el que la población de células se ve reducida un 50% o 10%.

Para calcular los valores de LC50 y LC10 se aplican las ecuaciones:

$$LC50 = -\ln 0.5 / \Omega$$

$$LC10 = -\ln 0.9 / \Omega$$

Donde  $\Omega$  es la pendiente de la relación entre el deterioro de la abundancia en la célula y la concentración del contaminante en relación (C/Ccontrol) alcanzado a finales de los tratamientos experimentales.

### Control de calidad

La técnica está sometida a los errores ya descritos con anterioridad. Los resultados se compararán con las tasas de crecimiento obtenidas con otros métodos.

## Referencias

- DACHS, J., R. LOHMANN, W. A. OCKENDEN, L. MÉJANELLE, S. J. EISENREICH, K. C. JONES. 2002. «Oceanic biogeochemical controls on global dynamics of persistent organic pollutants». *Environ. Sci. Technol.* 36: 4229-4237.
- DACHS, J., L. MÉJANELLE. 2010. «Organic pollutants in coastal waters, sediments and biota: a relevant driver for ecosystems during the anthropocene?» *Est. Coast.* 33: 1-14.
- ECHEVESTE, P., J. DACHS, N. BERROJALBIZ, S. AGUSTÍ. 2010. «Decrease in the abundance and viability of oceanic phytoplankton due to trace levels of complex mixtures of organic pollutants». *Chemosphere* 81: 161-168.
- GREGORI, G., S. CITTERIO, A. GHIANI, M. LABRA, S. SGORBATI, S. BROWN, M. DENIS. 2001. «Resolution of Viable and Membrane-Compromised Bacteria in Freshwater and Marine Waters Based on Analytical Flow Cytometry and Nucleic Acid Double Staining». *Appl Environ Microbiol.* 67 (10): 4662-4670.
- JURADO, E., J. DACHS. 2008. «Seasonality in the “grasshopping” and atmospheric residence times of persistent organic pollutants over the oceans». *Geophys. Res. Lett.* doi:10.1029/2008GL034698 (L17805).
- LOHMANN, R., K. BREIVIK, J. DACHS, D. MUIR. 2007. «Global fate of POPs: current and future research directions». *Environ. Pollut.* 150: 150-186.
- MUIR, D. C. G., P. HOWARD. 2006. «Are there other persistent organic pollutants? A challenge for analytical chemists». *Environ. Sci. Technol.* 40: 7157-7166.

# Tasas de predación y crecimiento del fitoplancton mediante técnicas de dilución

<sup>1,2</sup>Agustí, S.; <sup>1</sup>Puerta, P.

<sup>1</sup>*Instituto Mediterráneo de Estudios Avanzados (UIB-CSIC)*

<sup>2</sup>*The UWA Oceans Institute and School of Plant Biology  
University of Western Australia*

## Finalidad. Campo de aplicación

El objetivo es cuantificar las tasas de crecimiento y de pérdidas del fitoplancton por la predación del microzooplancton. Se utilizará el método de la dilución (Landry y Hassett, 1982; Landry, 1995) en el que se utiliza agua de mar filtrada para crear un gradiente de diluciones de forma que se crea un gradiente equivalente en la presión de predación del microzooplancton sobre el fitoplancton. La tasa de predación se calcula examinando la tasa de crecimiento del fitoplancton en el gradiente de diluciones. En este capítulo se describe además una modificación del método de la dilución en el que se experimenta con los materiales de las botellas de incubación utilizada en la Expedición Malaspina-2010, de forma que se pueda analizar la importancia de la radiación ultravioleta en el balance crecimiento-pérdidas de las poblaciones de fitoplancton.

## Conceptos generales

En la técnica de la dilución, la mortalidad por pastoreo es proporcional al efecto de la dilución, de forma que las muestras más diluidas deberían tener menos depredadores y presentar una tasa de crecimiento mayor que muestras no diluidas. La tasa de crecimiento del fitoplancton es independiente del efecto de la dilución, es decir, es constante con relación a su abundancia. La técnica descrita en los años ochenta (Landry y Hassett, 1982) ha ido perfeccionándose desde entonces tras varias revisiones y ar-

títulos que han examinado críticamente los resultados, en función a cambios en las condiciones de incubación, y en los cálculos de las tasas (ej. Landry, 1993, Landry et ál., 1995; Calbet y Landry, 2004; Dolan y McKeon, 2005; Landry y Calbet, 2005). A las diluciones se les añade nutrientes para homogeneizar el crecimiento del fitoplancton, y evitar respuestas al aumento de nutrientes en las diluciones mayores de aguas con limitación nutritiva. En estos casos, el y-intercepto de la regresión de diluciones puede no ser representativo de la tasa de crecimiento real. Por esta razón, se añade un control sin nutrientes para calcular la tasa neta de crecimiento del fitoplancton, y compararla con la tasa inmediata con adición de nutrientes.

La asunción de que la tasa de predación varía proporcionalmente a la dilución tiene sin embargo algunos problemas conceptuales y metodológicos. Principalmente, es difícil que la densidad de predadores se mantenga proporcional entre las diluciones con relación a la proporción inicial. Por ejemplo, la abundancia de los flagelados, puede descompensarse debido a que también son presas de los ciliados, y dado que los flagelados y los ciliados (componente principal del microzooplancton) tienen un potencial de altas tasas de crecimiento esta descompensación puede aumentar con el tiempo del experimento.

### Equipamiento necesario

- Citómetro de flujo.
- Fluorómetro Turner Designs.
- Tanque y sistema de incubación en la cubierta del barco.
- Rampa y soportes de filtración.
- Bomba de vacío.
- Bomba de agua.
- Bomba peristáltica.

### Reactivos u otro material fungible

#### Reactivos.-

- Acetona 90%.
- Glutaraldehído (1% en muestra).
- Ácido clorhídrico (para lavar).
- Soluciones de nutrientes: 0.5  $\mu\text{M}$  N-amonio (concentración final en la muestra) y 0.03  $\mu\text{M}$  de fosfato (concentración final en la muestra).

#### Fungible.-

- El necesario para contajes de picoplancton en el citómetro de flujo: tubos Falcon, gradillas, pipetas automáticas, puntas, Beads de calibración, vórtex, etc.

- Dispensador Glutaraldehído.
- El material necesario para análisis de clorofila:  
tubos centrifuga, cubetas de fluorómetro, filtros Wautman 25 mm, acetona 90%, pipetas Pasteur, dispensador, etc.
- Cartuchos de 0.2  $\mu\text{m}$ .
- Botes de Cuarzo 2 l.
- Botes de Policarbonato 2 l.
- Garrafas de 20 l x 2.
- Garrafas de 10 l x 2.

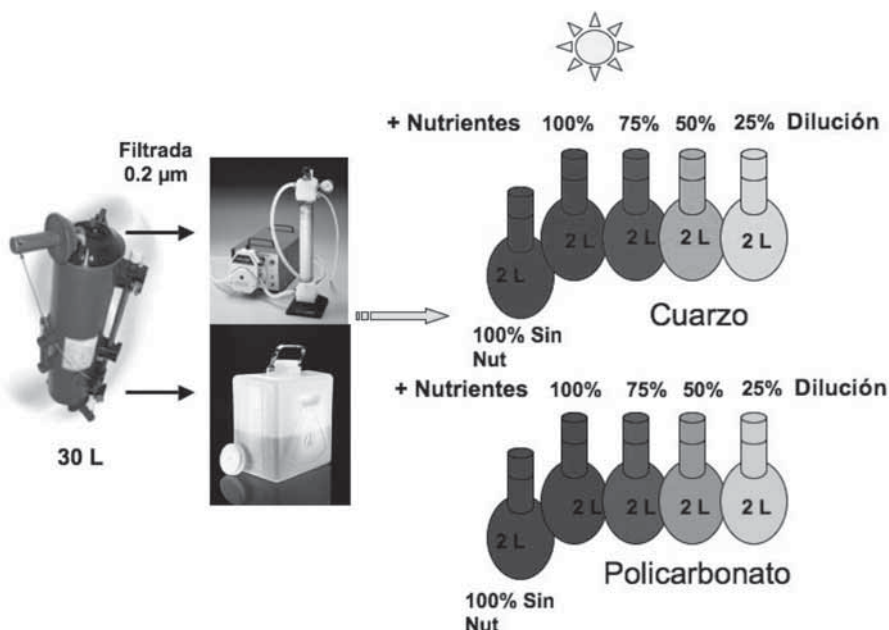
### Descripción de la técnica

Se aplicará el método modificado de dilución (Landry 1993, Landry et al., 1994) siguiendo los procedimientos descritos en Agawin y Agustí (2005). Para cada experimento se muestrea agua de superficie con el bote-lón Niskin de 30 l, de los que se recogerán 22 l de los cuales 8 l se filtrarán por 0.2  $\mu\text{m}$ . Se utilizarán 5 botellas de 2 l de policarbonato Nalgene (opa-cas a la radiación UV), y 5 botellas de cuarzo de 2 l (transparentes a la ra-diación UV), utilizando 4 y 4 de cada tipo para las diluciones enriquecidas con nutrientes. Diferentes volúmenes de agua filtrada y sin filtrar se dis-pensaran en cada botella para conseguir abundancias aproximadas al 25, 50, 75 y 100% de los contenidos ambientales, para cada serie de botellas de cuarzo o policarbonato. A cada botella se añadirán 0.5  $\mu\text{M}$  N-amonio y 0.03  $\mu\text{M}$  de fosfato (concentraciones finales). Una botella de policarbonato se llenará de agua de mar filtrada por 0.2  $\mu\text{m}$  para cuantificar las células que han podido pasar el filtro. 1 botella de cuarzo y otra de policarbonato se llenarán de agua de mar utilizarán como control 100% sin adición de nu-trientes. Las botellas se incubarán en cubierta en tanques con circuito de circulación de agua de superficie y expuestas a la radiación solar. Periódicamente, se analiza el efecto combinado de la temperatura, para lo cual se realizará la incubación del mismo esquema de experimento pero utilizando el doble de botellas que serán incubadas a dos temperaturas diferentes, a temperatura ambiente y a una temperatura 2-3 °C por encima de la tempe-ratura ambiente del agua de superficie, para lo que se utilizan los enfriadores de superficie del *BIO Hespérides*.

Las botellas se incubarán durante 24 horas. Se tomarán submuestras de 50-100 ml de cada botella al inicio, y a las 24 horas, para el análisis fluoro-métrico de la concentración de clorofila a (según el método descrito pre-viamente). El análisis de la respuesta de las poblaciones de picofitoplanc-ton se analizará en submuestras duplicadas de 2 ml, que se tomarán en los mismos intervalos de muestreo, y que serán analizadas inmediatamente en el citómetro de flujo o, serán fijadas con glutaraldehído (1% concentración final) y congeladas a -80 °C hasta su análisis. En algunos experimentos, las

muestras se analizarán en vivo además, para cuantificar los cambios en la proporción de células vivas, siguiendo el método de la digestión celular, descrito con anterioridad.

### Cuadro sinóptico de la técnica



### Cálculo de los resultados

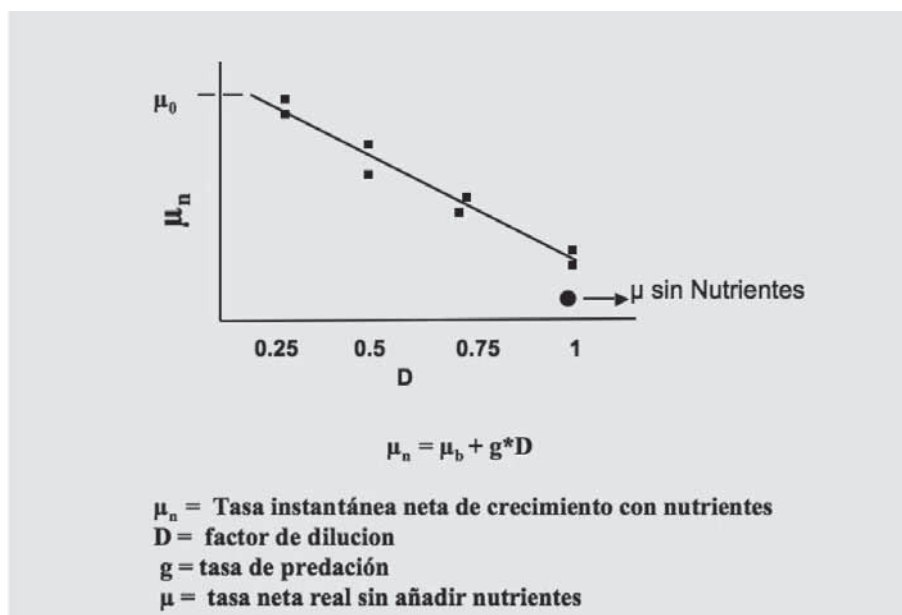
En cada tratamiento o dilución, se mide la concentración de clorofila y la abundancia de las distintas poblaciones de pico-fitoplancton al inicio y después del tiempo de incubación (24 o 48 h) y se calcula la tasa neta de crecimiento ( $\mu_{Dx}$ , Ec. 1) a partir de los cambios observados entre las medidas iniciales y al final de la incubación.

$$\mu_{Dx} = \frac{\ln(Abundancia)_{t=0} - \ln(Abundancia)_{t=n}}{t(n)} \quad (1)$$

La tasa de predación (g) se calcula como la pendiente de la regresión entre la tasa neta de crecimiento aparente ( $\mu_n$ ) y el factor de dilución (D). Esta pendiente es la tasa de predación instantánea, de forma que cuando en un experimento la pendiente no es significativa, se asume que la tasa de



predación es 0 o indetectable (Landry y Calbet, 2005). El intercepto de la regresión entre la tasa de crecimiento en cada dilución y el factor de dilución, es equivalente a la tasa bruta con nutrientes. La tasa bruta se calcula a partir de la suma de la tasa de predación y la tasa media neta calculada en las botellas sin adición de nutrientes.



## Control de calidad

La técnica está sometida a los errores ya descritos con anterioridad. Los resultados se compararan con las tasas de crecimiento obtenidas con otros métodos.

## Referencias

- AGAWIN N. S., S. AGUSTÍ. 2005. «*Prochlorococcus* and *Synechococcus* cells in the central Atlantic Ocean: distribution, growth, and mortality (grazing) rates». *Vie et Milieu* 55: 165-175.
- CALBET A., M. R. LANDRY. 2004. «Phytoplankton growth, microzoo- plankton grazing and carbon cycling in marine Systems». *Limnol. Oceanogr.* 49: 51-57.

- DOLAN, J. R., K. McKEON. 2005. «The reliability of grazing rate estimates from dilution experiments: Have we over-estimated rates of organic carbon consumption by microzooplankton?». *Ocean Sci.* 1: 1-7.
- LANDRY, M. R., R. P. HASSETT. 1982. «Estimating the grazing impact of marine micro-zooplankton». *Mar. Biol.* 67: 283-288.
- LANDRY, M. R. 1994. «Methods and controls for measuring the grazing impact of planktonic protists». *Mar. microb. Food Webs.* 8: 37-57.
- LANDRY, M. R., J. KIRSHTEN, J. CONSTANTINOU. 1995. «A refined dilution technique for measuring the community grazing impact of microzooplankton, with experimental tests in the central equatorial Pacific». *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 120: 53-63.
- LANDRY, M. R., A. CALBET. 2005. «Reality checks on microbial food web interactions in dilution experiments: responses to the comments of Dolan and McKeon». *Ocean Sci.* 1: 39-44.



# BIODIVERSIDAD MICROBIANA Y FUNCIÓN ECOLÓGICA

---



# Muestreo para recuentos de microorganismos por epifluorescencia

Massana, R.

*Institut de Ciències del Mar (CSIC)*

## Finalidad. Campo de aplicación

Los filtros preparados se inspeccionarán en microscopía de epifluorescencia para observar, categorizar y cuantificar distintos grupos de microorganismos planctónicos que no son observables por microscopía óptica con luz transmitida, ya que son demasiado pequeños. Los microorganismos se agruparán en 4 categorías, plancton procariota heterotrófico y fototrófico (picocianobacterias), y plancton picoeucariota heterotrófico y fototrófico. Para cada grupo se harán distintas clases de tamaño y se anotarán las principales características morfológicas (tamaño, forma y número de cloroplastos etc.). Algunos de estos grupos también son cuantificables por citometría de flujo, técnica que es mucho más rápida pero menos informativa a nivel cualitativo. Ambas técnicas son claramente complementarias y se compararán en todo momento, de manera que se podrá optimizar el nivel de esfuerzo en los recuentos de epifluorescencia. La metodología para los recuentos de flagelados heterotróficos por citometría de flujo es muy reciente (Zubkov y Tarran, 2007; Christaki et ál., 2011), por lo que se aconseja que sean comparados por recuentos directos por epifluorescencia.

## Conceptos generales

Los microorganismos son muy importantes para los sistemas marinos a distintos niveles, y son un componente central del proyecto Malaspina. Obviamente, su importancia está inicialmente canalizada por su abundancia y

biomasa, parámetros que, especialmente para las picoeucariotas heterotróficas, solo pueden obtenerse fielmente por microscopía de epifluorescencia. Ésta es una técnica clásica en ecología microbiana (Porter y Feig, 1980; Sherr y Sherr, 1993) y es ampliamente utilizada por la mayoría de laboratorios que trabajan en microbiología marina.

### Equipamiento necesario

Las muestras se toman directamente de las botellas oceanográficas convencionales de 12 l de capacidad montadas en una roseta oceanográfica. Tras la fijación de las muestras, es necesario un equipo de filtración múltiple (para filtros de 25 mm) equipado con embudos de extensión para 100 ml de muestra y una bomba de vacío, con el fin de conseguir un procesado rápido de las muestras.



Bomba de vacío



Equipo de filtración múltiple

### Reactivos u otro material fungible

#### Glutaraldehído al 10%, frío

Se diluye el glutaraldehído comercial (25%) con agua ultrapura (Milli-Q o similar) (600 ml de agua ultrapura + 400 ml de glutaraldehído 25%), se filtra por 0.2  $\mu\text{m}$  y se guarda a 4 °C.

#### DAPI (0,5 mg ml<sup>-1</sup>)

- Añadir 1 ml de agua ultrapura a 10 mg de DAPI (dentro de la botella comercial).
- Mezclar y transferir a un tubo Falcon de 50 ml. Añadir 1 ml más a la botella comercial. Repetir el proceso hasta diluir los 10 mg en 20 ml.

- Filtrar por 0.2  $\mu\text{m}$ , hacer alícuotas de 1 ml en tubos de 1.5 ml, y guardar a -20 °C en oscuridad. Evitar congelar y descongelar muchas veces.

## Calibración

Los factores de conversión del microscopio se calculan a partir del área efectiva usada por el sistema de filtración y del área del campo de observación del microscopio, que se deberá calibrar con un porta-micrómetro.

## Descripción de la técnica

### A) FIJAR LA MUESTRA

- Fijar con 10% glutaraldehído frío (1% concentración final). En superficie, fijar 36 ml de muestra con 4 ml de fijador; en mar profundo fijar 198 ml de muestra con 22 ml de fijador.
- Dejar actuar el fijador a 4 °C en oscuridad entre 1-24 horas antes de preparar los filtros.

### B) PREPARACIÓN DE FILTROS PARA PROCARIOTAS

- Colocar un filtro de acetato de celulosa de 0.8  $\mu\text{m}$  (25 mm diámetro) en el sistema de filtración y añadir unas gotas de agua ultrapura.
- Colocar un filtro de policarbonato de 0.2  $\mu\text{m}$  encima del filtro de acetato de celulosa.
- Añadir la muestra (5 ml en superficie; 20 ml en profundidad). Filtrar hasta reducir el volumen a 5 ml en todas las torres de filtración. Añadir 50  $\mu\text{l}$  de DAPI (0.5 mg ml<sup>-1</sup>). Dejar 3 minutos en oscuridad y filtrar.
- Colocar el filtro en un porta, añadir una gota de aceite de inmersión no fluorescente, y cubrir con un cubreobjetos sin atrapar burbujas de aire debajo de este.
- Marcar el porta con el nombre y volumen de la muestra.

### C) PREPARACIÓN DE FILTROS PARA PICOEUCARIOTAS

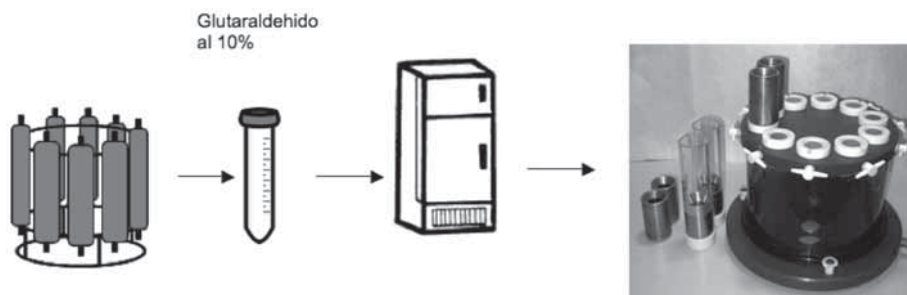
- Colocar un filtro de acetato de celulosa de 0.8  $\mu\text{m}$  (25 mm diámetro) en el sistema de filtración y añadir unas gotas de agua ultrapura.
- Colocar un filtro de policarbonato de 0.6  $\mu\text{m}$  encima del filtro de acetato de celulosa.
- Añadir la muestra (30 ml en superficie; 200 ml en profundidad). Filtrar hasta reducir el volumen a 5 ml en todas las torres de filtración. Añadir 50  $\mu\text{l}$  de DAPI (0.5 mg ml<sup>-1</sup>). Dejar 3 minutos en oscuridad y filtrar.

- Colocar el filtro en un porta, añadir una gota de aceite de inmersión no fluorescente, y cubrir con un cubreobjetos sin atrapar burbujas de aire debajo de este.
- Marcar el porta con el nombre y volumen de la muestra.

#### D) ALMACENAJE DE LAS MUESTRAS A BORDO

- Guardar los portas en una caja de preparaciones y almacenar a -20 °C.

### Cuadro sinóptico de la técnica



### Cálculo de los resultados

La concentración de cada grupo se calculará multiplicando el número de organismos observados por el factor de microscopio (relación entre área del sistema de filtración y el área del campo de observación) y por el factor de dilución de la fijación (10/9), y dividiendo por el volumen filtrado.

### Control de calidad

Los recuentos de epifluorescencia dan valores robustos si se cuenta un número suficiente de campos. Se recomienda contar campos hasta que el error estándar de los recuentos sea alrededor del 10% del valor medio.

### Referencias

- CHRISTAKI, U., C. COURTIES, R. MASSANA, P. CATALAN, P. LEBARON, J. M. GASOL, M. V. ZUBKOV. 2011. «Optimized routine flow cytometric enumeration of heterotrophic flagellates using SYBR Green I». *Limnol. Oceanogr. Meth.* 9: 329-339.



- PORTER, K. G., Y. S. FEIG. 1980. «The use of DAPI for identifying and counting aquatic microflora». *Limnol. Oceanogr.* 25: 943-948.
- SHERR, E. B., B. F. SHERR. 1993. «Preservation and storage of samples for enumeration of heterotrophic protists». En: KEMP, P. F., SHERR, B. F., SHERR, E. B., COLE, J. J. (eds.), *Handbook of Methods in Aquatic Microbial Ecology*, Lewis Publishers, Boca Raton, pp. 207-212.
- ZUBKOV, M. V., P. H. BURKILL, J. N. TOPPING. 2007. «Flow cytometric enumeration of DNA-stained oceanic planktonic protists». *J. Plankton Res.* 29: 79-86.



# Determinación de la abundancia y la actividad individual de bacterias y arqueas mediante citometría de flujo

<sup>1</sup>Gasol, J. M.; <sup>1</sup>Sarmiento, H.; <sup>2</sup>Morán, X. A. G

<sup>1</sup> *Institut de Ciències del Mar (CSIC)*

<sup>2</sup> *C. O. Xixón. Instituto Español de Oceanografía*

## Finalidad. Campo de aplicación

Se trata de determinar la abundancia y la actividad individual de procariontas (bacterias y arqueas) por medio de citometría de flujo. El protocolo tiene dos partes:

- recogida de muestras, fijación y mantenimiento.
- análisis por citometría de la abundancia de bacterias total [de bajo (LNA) y de alto (HNA) contenido relativo en ácidos nucleicos], con respiración activa (protocolo CTC) y vivas-muertas (protocolo NADS).

El análisis de algunos protocolos (abundancia de bacterias) puede efectuarse en el barco o en el laboratorio. Otros (NADS, CTC) solo pueden hacerse en el barco.

## Conceptos generales

Los protocolos que seguimos están desarrollados en Gasol (1999) y Gasol y Del Giorgio (2000). También en Gasol y Arístegui (2007, para el CTC) y en Falcioni et ál. (2008, para el NADS). En la mayor parte de muestras de superficie en los giros oligotróficos las poblaciones de *Prochlorococcus* aparecen superpuestas a las de bacterias heterotróficas o a las poblaciones de bacterias CTC+. Por tanto, y para obtener una estima no sesgada de estas abundancias, es necesario determinar también la abundancia de estos

organismos autótrofos con fluorescencia propia (autofluorescencia) para poder restarla de la de bacterias totales. El mejor protocolo publicado para ello es el de Marie y Partenski (2006).

Los protocolos arriba citados se desarrollaron utilizando un citómetro de flujo estándar, el FACSCalibur de Becton-Dickinson, que usa un láser azul, de 488 nm. Sin embargo, a continuación se describen de forma esquemática y generalista pero siempre para un citómetro equipado de láser azul. La adaptación a otro tipo concreto de máquina será más o menos difícil según sus características concretas.

### Equipamiento necesario

- Citómetro de flujo, por ejemplo FACSCalibur de BD (Becton-Dickinson).
- Vórtex.
- Pipetas para dispensado de muestras y para medida de los flujos.
- Bidón de nitrógeno líquido.
- Sonicador.

### Reactivos u otro material fungible

- Fijador: Solución de paraformaldehído (PFA) con glutaraldehído (1% + 0.05% final): P+G

#### Preparación de la solución de P+G (1 litro):

- Pesar 100 g de PFA (Sigma P6148).
- Colocar en 880 ml dH<sub>2</sub>O en un recipiente con una mosca magnética y cubrirlo con parafilm. El agua debe estar muy caliente, casi hirviendo.
- Dejar >24 h en una campana de gases sobre un calentador (90 °C) con mezclado magnético.
- Después de la disolución (puede durar días), añadir 100 ml de PBS (“phosphate-buffered saline solution”). El PBS se prepara con una pastilla de Sigma P4417 (1 en 200 ml).
- Añadir 20 ml de glutaraldehído 25%.
- Filtrar a través de un filtro de policarbonato de 0.2 µm en la campana con un sistema de filtración que se use solo para eso.
- Distribuir en tubos de 5, 20 ml y 50 ml.
- Congelar a -80 °C.
- Guardar los tubos a -20 °C.
- Una vez descongelado el tubo debe usarse en el plazo máximo de una semana.

- Crioviales de 2 ml.
- Tubos de citómetro. En el caso del citómetro FACSCalibur se trata de un modelo concreto de tubo. Otras máquinas pueden usar cualquier tipo de tubo.
- Tinción SybrGreen I (Molecular Probes o Sigma), diluida 10x con DMSO (mantener congelada).
- Nitrógeno líquido
- Solución de bolas de plástico fluorescentes (*beads*) de 1  $\mu\text{m}$  a ca.  $10^8 \text{ ml}^{-1}$  (Molecular Probes o Polysciences), de la cual se preparan dos soluciones de trabajo a  $10^7$  y  $10^6 \text{ ml}^{-1}$ . Al mezclar 10  $\mu\text{l}$  en 200-400  $\mu\text{l}$  de muestra se obtienen concentraciones de  $10^6$  y  $10^5 \text{ ml}^{-1}$ , aproximadamente.
- Solución de CTC (Polysciences ref. 19292). Solución de trabajo a 50 nmol  $\text{l}^{-1}$  en agua ultrapura. Filtrar por un filtro de 0.2  $\mu\text{m}$  y mantener en frío y a oscuras.
- Solución de PI (yoduro de propidio, Sigma) en agua. Solución de trabajo a 1 mg  $\text{ml}^{-1}$  (mantener congelada).

## Descripción de la técnica

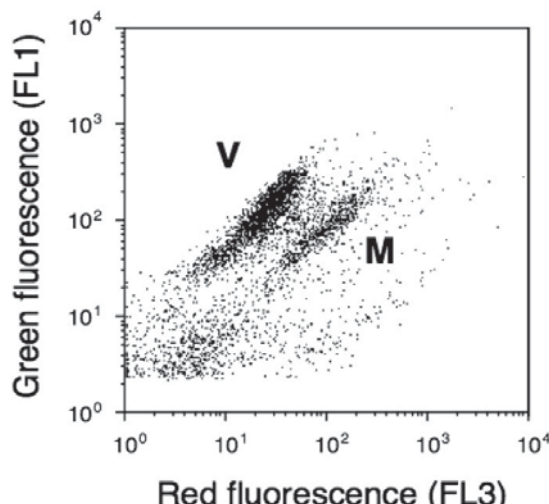
- **Recogida de muestras.**
- Siguiendo el esquema adjunto, se recogen muestras de las botellas oceanográficas con una botella de plástico oscuro limpiada con ácido y agua ultrapura.

Se depositan alícuotas de 0.4 ml en tubos de citómetro para el protocolo NADS (protocolo Num. 1), alícuotas de 0.9 ml para el protocolo CTC (protocolo Num. 2) y alícuotas de 1 ml para determinar la concentración de *Prochlorococcus* (protocolo Num. 3). Además, se distribuyen alícuotas de 1.2 ml en crioviales por duplicado. Estas muestras se fijan con P+G y se congelan. Una de ellas se guarda como réplica de seguridad. La otra se utilizará para medir a bordo la concentración total (LNA+HNA) de bacterias heterotróficas (protocolo Num. 4).

- **Fijación de muestras para bacterias.**
- Se toman 1.2 ml de la muestra y se depositan en un criovial. Se fija con 120  $\mu\text{l}$  de la solución de P+G.
- Se mantienen 10 min. en oscuridad.
- Congelar en nitrógeno líquido. Luego se pueden guardar a  $-80^\circ\text{C}$ .
- **Acciones preliminares en el citómetro.**
- El proceso para poner en marcha el citómetro varía según los modelos. En todo caso debe reemplazarse el fluido (habitualmente agua ultrapura ya sirve), e iniciar el *software* de control de la máquina.

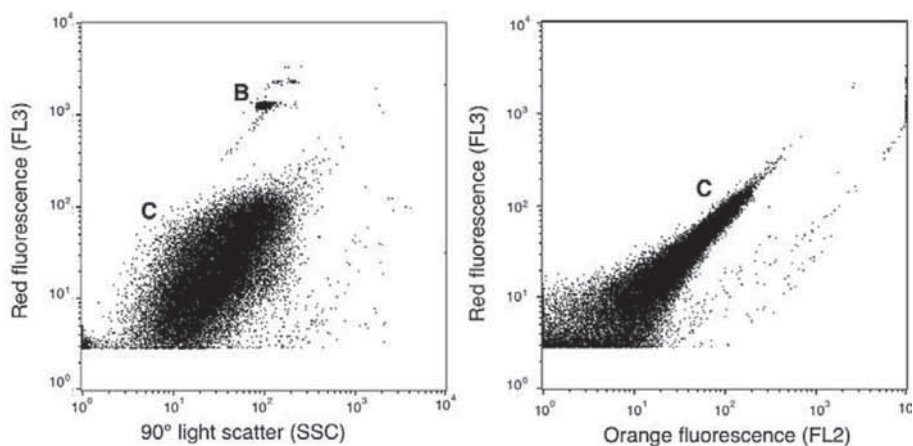
**PROTOCOLO Num. 1 (Bacterias vivas y muertas - NADS)**

- Se trata de obtener una imagen como la que viene a continuación. Para ello es necesario representar la fluorescencia roja del yoduro de propidio (FL3 en un FACSCalibur estándar) frente a la fluorescencia verde que produce el SybrGreen I cuando interactúa con el DNA.
- Debe seleccionarse un umbral para la fluorescencia verde y las adquisiciones deben ser en logarítmico.
- Deben realizarse los ajustes colocando las bolitas fluorescentes en el centro de la imagen. En un FACSCalibur funciona bien con estos ajustes: FSC: E02, SSC: 427, FL1: 453, FL2: 431, FL3: 542 (umbral o *threshold* a FL1: 59).
- Proceso típico: se depositan 0.4 ml de muestra + 4  $\mu$ l de SybrGreen + 4  $\mu$ l de PI (yoduro de propidio); se mezcla, y se deja incubar 15 min. Es importante que las dos tinciones entren en contacto con la muestra simultáneamente (lo más fácil es depositar la gota de cada tinción en paredes opuestas del tubo). Se le añaden 10  $\mu$ l de una solución de *beads* a  $10^7$  ml<sup>-1</sup>.
- A continuación, se pasan las muestras a una velocidad baja (por ejemplo 12  $\mu$ l min<sup>-1</sup>). Finalizar la adquisición de datos con 100000 eventos o después de 2 minutos.
- La observación de resultados se hace en una gráfica de fluorescencia verde frente a roja y al menos otra de fluorescencia verde frente a dispersión lateral de la luz (*side scatter*, *ssc*).
- No olvidar escribir en la libreta el volumen de muestra y de *beads* usado junto con los tiempos inicial y final.
- Se procesa determinando el número de partículas en la población M (“muertas”) y en la V (“vivas”).



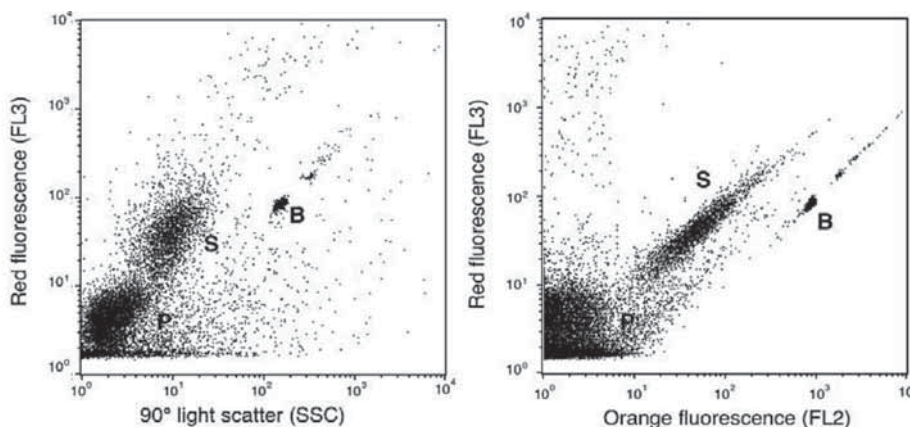
**PROTOCOLO Num. 2 (Bacterias respirando activamente - CTC)**

- Se trata de obtener una imagen como la que viene a continuación. Para ello es necesario representar la fluorescencia roja del CTC (FL3 en un FACSCalibur estándar) frente a la fluorescencia naranja (FL2 en un FACSCalibur estándar).
- Debe seleccionarse un umbral para la fluorescencia roja y las adquisiciones deben ser en logarítmico.
- Deben realizarse los ajustes colocando las bolitas fluorescentes como en la imagen. En un FACSCalibur funciona bien con estos ajustes: FSC: E02, SSC: 400, FL1: 500, FL2: 643, FL3: 597 (umbral o *threshold* a FL3: 90).
- Proceso típico: se depositan 0.25 ml de muestra + 28  $\mu$ l de la solución stock de CTC; se mezcla, y se deja incubar un tiempo variable entre las 2 horas (superficie) y las 10 horas (muestras de profundidad). Se le añaden 10  $\mu$ l de una solución de *beads* a  $10^7$  ml<sup>-1</sup>.
- A continuación, se pasan las muestras a una velocidad alta (por ejemplo 60  $\mu$ l min<sup>-1</sup>). Finalizar la adquisición de datos con 100000 eventos o después de 3 minutos.
- La observación de resultados se hace en una gráfica de fluorescencia roja frente a dispersión lateral de la luz (*side scatter*); y con una que represente fluorescencia roja frente a naranja.
- No olvidar escribir en la libreta el volumen de muestra y de *beads* usado junto con los tiempos inicial y final.
- Se procesa determinando el número de partículas en la población C ("CTC+"). Debe prestarse atención a la posición de los *Prochlorococcus* en muestras de la superficie de los océanos cálidos y oligotróficos, que puede superponerse a la población C. Si es así, se enumeran junto a la C y se les resta el valor obtenido con el protocolo Num. 3 (en la figura, B son las bolas fluorescentes).



**PROTOCOLO Num. 3 (*Prochlorococcus*)**

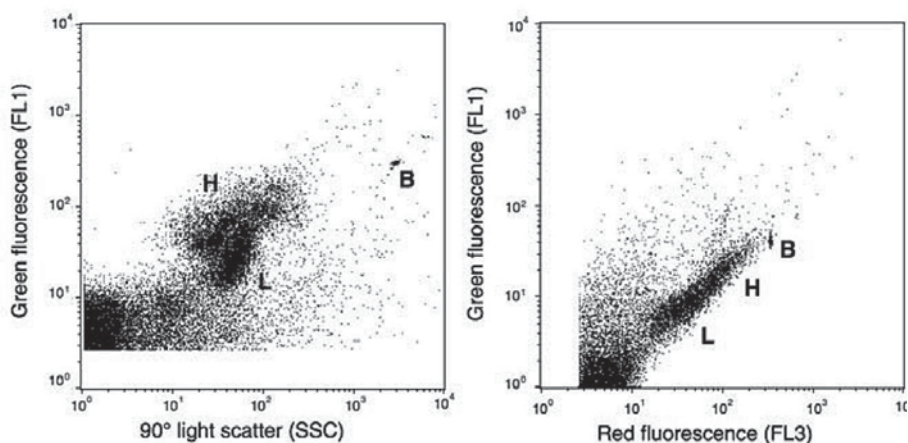
- Se trata de obtener una imagen como la que viene a continuación. Para ello es necesario representar la fluorescencia roja de la clorofila (FL3 en un FACSCalibur estándar) frente a la dispersión lateral de luz (SSC), y la fluorescencia roja frente a la fluorescencia naranja (FL2 en un FACSCalibur estándar) de la ficoeritrina.
- Debe seleccionarse un umbral para la fluorescencia roja y las adquisiciones deben ser en logarítmico.
- Deben realizarse los ajustes colocando las bolitas fluorescentes como en la imagen. En un FACSCalibur funciona bien con estos ajustes: FSC: E01, SSC: 367-400, FL1: 400, FL2: 505-580, FL3: 590-623 (umbral o *threshold* a FL3: 20-70).
- Proceso típico: se depositan 0.4 ml de muestra. Se le añaden 10  $\mu$ l de una solución de *beads* a  $10^6$  ml<sup>-1</sup>.
- A continuación, se pasan las muestras a una velocidad alta (por ejemplo 60  $\mu$ l min<sup>-1</sup>). Finalizar la adquisición de datos con 100000 eventos o después de 5 minutos.
- La observación de resultados se hace en una gráfica de fluorescencia roja frente a dispersión lateral de la luz (*side scatter*); y con una que presente fluorescencia roja frente a naranja.
- No olvidar escribir en la libreta el volumen de muestra y de *beads* usado junto con los tiempos inicial y final.
- Se procesa determinando el número de partículas en la población P (en la figura, S son *Synechococcus* y B son las bolas fluorescentes).

**PROTOCOLO Num. 4 (Bacterias y arqueas totales)**

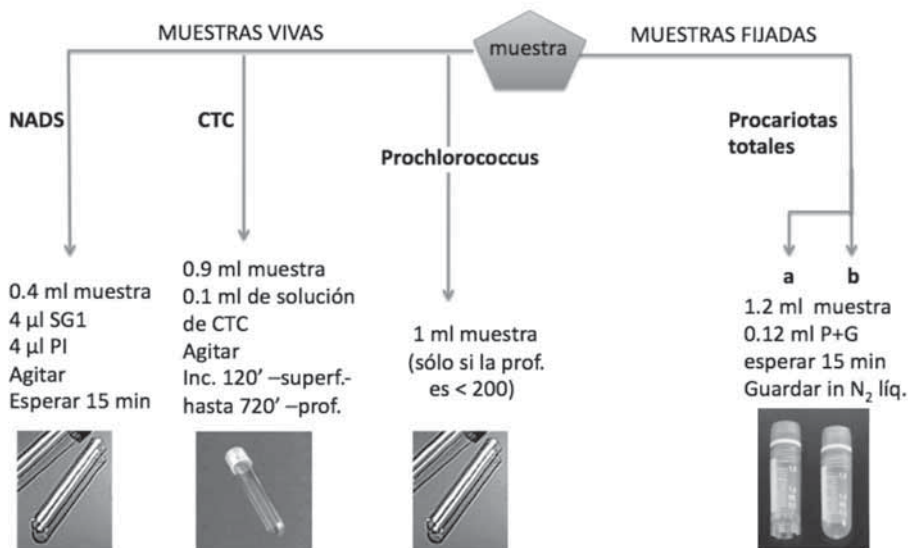
- Dejar descongelar las muestras, a temperatura ambiente y en oscuridad.



- Se trata de obtener una imagen como la que viene a continuación. Para ello es necesario representar la fluorescencia verde del DNA (FL1 en un FACSCalibur estándar) frente a la dispersión lateral de luz (SSC). Es muy útil representar también la fluorescencia roja (de la clorofila, FL3) frente a la fluorescencia verde para distinguir picroalgas de bacterias.
- Debe seleccionarse un umbral para la fluorescencia verde y las adquisiciones deben ser en logarítmico.
- Deben realizarse los ajustes colocando las bolas fluorescentes como en la imagen. En un FACSCalibur funciona bien con estos ajustes: FSC: E02, SSC: 400; FL1: 511, FL2: 400, FL3: 590 (umbral o *threshold* a FL1: 72).
- Proceso típico: se depositan 0.4 ml de muestra. Se añaden 4  $\mu\text{l}$  de la disolución de SybrGreen I en DMSO. Se espera unos 5 minutos. Se le añaden 10  $\mu\text{l}$  de una solución de *beads* a  $10^7 \text{ ml}^{-1}$ .
- A continuación, se pasan las muestras a una velocidad baja (por ejemplo  $12 \mu\text{l min}^{-1}$ ). Finalizar la adquisición de datos con 100000 eventos o después de 2 minutos.
- La observación de resultados se hace en una gráfica de fluorescencia verde frente a dispersión lateral de la luz (ssc).
- No olvidar escribir en la libreta el volumen de muestra y de *beads* usado junto con los tiempos inicial y final.
- Se procesa determinando el número de partículas en la población L y en la población H para las bacterias con bajo (L) y alto (H) contenido de DNA. La suma de L+H da el número total de bacterias (en la figura B son las bolas fluorescentes).
- Debe controlarse la velocidad de paso de muestra. Si excede 800 las partículas  $\text{s}^{-1}$ , se debería diluir la muestra con agua ultrapura y volver a empezar el protocolo de tinción.



## Cuadro sinóptico de la técnica



## Cálculo de los resultados

- Con los programas CellQuest o Paint-A-Gate se procesa la muestra para marcar las poblaciones de interés y contar cuántas partículas hay en ellas.
- El número de partículas se convierte en concentración a partir del tiempo transcurrido en cada muestra y la velocidad de análisis ( $\mu\text{l min}^{-1}$ ).
- La velocidad exacta (LO o HI) se determina con las bolas fluorescentes de concentración conocida o bien midiendo el volumen de agua ultrapura antes y después de 10 minutos de análisis a la velocidad seleccionada con una pipeta de 1 ml.

## Control de calidad

- El control de calidad se define a dos niveles: por un lado debe verse bien la imagen del citograma, con las poblaciones en su lugar, y sin que se observe ningún tipo de ruido superpuesto, y por otro lado deben encontrarse concentraciones razonables de organismos.
- Es importante controlar diariamente las velocidades de flujo.

## Referencias

- FALCIONI, T., S. PAPA, J. M. GASOL. 2008. «Evaluating the flow-cytometric nucleic acid double-staining protocol in realistic situations of planktonic bacterial death». *Appl. Environ. Microbiol.* 74: 1767-1779.
- GASOL, J. M., J. ARISTEGUI. 2007. «Cytometric evidence reconciling the toxicity and usefulness of CTC as a marker of bacterial activity». *Aquat. Microb. Ecol.* 46: 71-83.
- GASOL, J. M., P. A. DEL GIORGIO. 2000. «Using flow cytometry for counting natural planktonic bacteria and understanding the structure of planktonic bacterial communities». *Sci. Mar.* 64: 197-224.
- GASOL, J. M. 1999. «How to count algae and bacteria with the FACScalibur flow cytometer». 2<sup>nd</sup> edition. Dirección web: [http://www.icm.csic.es/bio/projects/icmicrobis/pdf/Manual\\_Citometre.PDF](http://www.icm.csic.es/bio/projects/icmicrobis/pdf/Manual_Citometre.PDF)
- MARIE, D., F. PARTENSKY. 2006. «Analyse de micro-organismes marins». *En La cytométrie en flux*. Lavoisier, Paris, pp. 211-233.



## Muestreo para recuentos de flagelados heterotróficos por citometría de flujo

Massana, R.; Gasol, J. M.

*Institut de Ciències del Mar (CSIC)*

### Finalidad. Campo de aplicación

La citometría de flujo es una técnica inestimable para cuantificar la abundancia de distintos grupos microbianos (bacterias, cianobacterias, protistas fototróficos) y se utiliza ampliamente en oceanografía. Sin embargo, todavía no se aplica de forma rutinaria para cuantificar los protistas (nanoflagelados) heterotróficos (HNF). Para este fin existen dos protocolos descritos. El primero está basado en una tinción vital con Lysotracker que tiñe las vacuolas digestivas (de pH ácido) de los protistas heterotróficos antes de procesar la muestra en el citómetro (Rose et ál. 2004). El segundo protocolo está basado en la tinción del DNA de los flagelados heterotróficos (con SYBRGreen I) y su separación en los citogramas por su contenido de DNA superior al de las bacterias (Zubkov et ál. 2007, Christaki et ál. 2011) y la ausencia de autofluorescencia de la clorofila. El protocolo de Rose et ál. (2004) debe realizarse con muestras vivas, mientras que el de Zubkov et ál. (2007) puede realizarse en muestras fijadas, y los dos requieren tiempos de procesado >10 min. En el segundo caso el citómetro debe poder modificarse para las mediciones y no todos los modelos lo permiten. Estos condicionantes hacen muy difícil que puedan medirse los flagelados por citometría en una campaña en la cual se usan los citómetros para otras rutinas. Nosotros utilizaremos el segundo protocolo, ya que se puede aplicar en muestras fijadas, y también es más robusto (datos propios sin publicar). Además compararemos los valores obtenidos por citometría de flujo con los recuentos por epifluorescencia (véase el método correspondiente).

## Conceptos generales

Los microorganismos son muy importantes en los sistemas marinos y son un componente central del proyecto Malaspina. Los flagelados heterotróficos juegan un papel central en el concepto del bucle microbiano, como canalizadores de materia orgánica disuelta a niveles tróficos superiores y como remineralizadores de nutrientes inorgánicos. Obviamente, su importancia está principalmente ligada a su biomasa, y la aplicación de citometría de flujo en las muestras de Malaspina permitirá una visión general de su distribución y abundancia en los distintos gradientes muestreados (vertical en la columna de agua, distintos océanos, masas de agua, etc.).

## Equipamiento necesario

Las muestras se toman directamente de las botellas oceanográficas montadas en la roseta oceanográfica. Tras la fijación de las muestras, los crioviales se sumergen en nitrógeno líquido y luego se guardan a -80 °C (o, en ausencia de congeladores de esta temperatura, a la más baja posible).

## Reactivos u otro material fungible

Glutaraldehído al 10%. También puede usarse formaldehído o paraformaldehído diluido en agua ultrapura (Milli-Q o similar).

Se diluye el glutaraldehído comercial (25%) con agua ultrapura (450 ml de agua ultrapura + 300 ml de glutaraldehído 25%), se filtra por 0.2 µm y se guarda a 4 °C. Se mantiene en frío.

## Calibración

Una vez en el laboratorio, la calibración de la velocidad de paso de muestra del citómetro de flujo se efectuará mediante medición del volumen procesado (pesado del tubo antes y después del análisis).

## Descripción de la técnica

### A) RECOGIDA DE MUESTRAS

- Se usarán muestras de 4.5 ml de las mismas botellas de donde se recojan muestras para abundancia bacteriana.
- Se preparan crioviales de 5 ml de buena calidad.

## B) FIJACIÓN DE LA MUESTRA

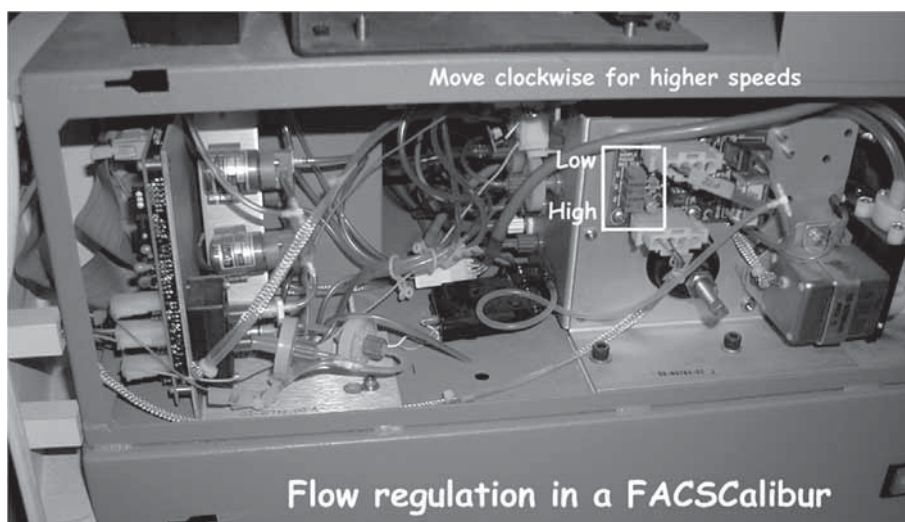
- Fijar con 10% glutaraldehído frío (1% concentración final): 4.5 ml de muestra con 0.5 ml de fijador.
- Después de unos 5-10 minutos de fijación a oscuras, congelar los crioviales en nitrógeno líquido.
- Guardar los crioviales a  $-80^{\circ}\text{C}$  (o la temperatura más baja posible) hasta su regreso al laboratorio en tierra. Allí las muestras se guardan a  $-80^{\circ}\text{C}$  y deben procesarse a los pocos meses.

## C) ALMACENAJE DE LAS MUESTRAS A BORDO

- Colocar los crioviales en cajas a  $-80^{\circ}\text{C}$  o temperatura lo más baja posible.

## D) ANÁLISIS POR CITOMETRÍA DE FLUJO

1. Ajustar la velocidad de paso de muestra del citómetro hasta, como mínimo,  $200\ \mu\text{l min}^{-1}$ . La imagen muestra qué botón debe operarse en el caso de un FACSCalibur de Becton-Dickinson. Como orientación, el voltaje de la muestra debe estar por debajo de 4.7 V para lograr una velocidad de  $200\ \mu\text{l min}^{-1}$  (más voltaje indica menos velocidad).



2. Descongelar la muestra a temperatura ambiente.
3. Añadir el colorante SYBRGreen I de Molecular Probes a la concentración de 1:10000 final que es la misma que se usa para bacterias. Zubkov et ál. (2007) recomienda la tinción el doble de concentrada,

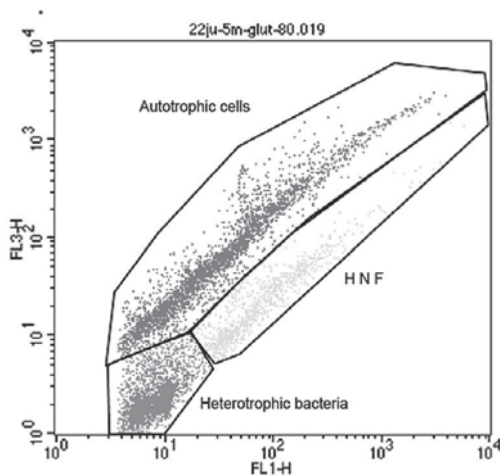
pero Christaki et ál. (2011) no lo consideran necesario. Dejar la muestra un mínimo de 10 minutos a oscuras mientras se tiñe.

4. Ajustar los settings del citómetro de forma que la parte superior de la población de bacterias quede en la quinta fracción (20% de la ventana) inferior de SSC y de FL1. Debe reducirse los voltajes de adquisición de esas dos variables, pero no el de FL3 (fluorescencia de la clorofila).
5. Dejar pasar la muestra durante 5-10 min dependiendo de la concentración esperada de HNF (en aguas batipelágicas incluso más).

#### E) PROCESAMIENTO DE LOS ARCHIVOS DE CITOMETRÍA DE FLUJO

[detalles en Christaki et ál. (2011)]

1. Establecer una imagen de SSC-FL1. Seleccionar una ventana (Gate1 o Gate-verde) de aquello que es de fluorescencia verde por encima de las bolas fluorescentes de 1  $\mu\text{m}$ .
2. Establecer una imagen SSC-FL3 y dibujar en ella lo que se está en la Gate1. Se crea una nueva ventana (Gate2 o Gate-roja) con lo que tiene fluorescencia roja.



3. Los datos que aparecen en la Gate2 se muestran en una ventana FL1-FL3 (figura siguiente) se puede separar las bacterias de los HNF de los flagelados autotróficos.
4. Finalmente los datos que aparecen en la ventana marcada "HNF" se muestran de nuevo en una ventana SSC-FL1, donde se puede separar con más precisión los HNF de las bacterias de mayor tamaño.

#### Calculo de los resultados

Se utilizará el protocolo detallado para los recuentos de bacterias por citometría de flujo, teniendo en cuenta el tiempo de paso de muestra, la velocidad (medida en cada muestra), y el número de células contadas en la ventana de interés. Detalles en Gasol (1999).



## Control de calidad

Se comparan los valores con los obtenidos por epifluorescencia.

## Referencias

- CHRISTAKI, U., C. COURTIES, R. MASSANA, P. CATALAN, P. LEBARON, J. M. GASOL, M. V. ZUBKOV. 2011. «Optimized routine flow cytometric enumeration of heterotrophic flagellates using SYBR Green I». *Limnol. Oceanogr. Meth.* 9: 329-339.
- GASOL, J. M. 1999. «How to count algae and bacteria with the FACScalibur flow cytometer». Dirección web: [http://www.icm.csic.es/bio/projects/icmicrobis/pdf/Manual\\_Citometre.PDF](http://www.icm.csic.es/bio/projects/icmicrobis/pdf/Manual_Citometre.PDF).
- ROSE, J. M., D. A. CARON, M. E. SIERACKI, N. POULTON. 2004. «Counting heterotrophic nanoplanktonic protists in cultures and aquatic communities by flow cytometry». *Aquat. Microb. Ecol.* 34: 263-277.
- ZUBKOV, M. V., P. H. BURKILL, J. N. TOPPING. 2007. «Flow cytometric enumeration of DNA-stained oceanic planktonic protists». *J. Plankton Res.* 29: 79-86.



# Determinación de abundancia de virus por citometría de flujo

Vaqué, D.; Boras, J. A.; Lara, E.; Sà, E. L.

*Institut de Ciències del Mar (CSIC)*

## Finalidad. Campo de aplicación

Se trata de determinar la abundancia de virus por medio de citometría de flujo. El protocolo tiene dos partes:

- recogida de muestras, fijación y mantenimiento a bordo.
  - análisis por citometría en el laboratorio.
- (El análisis puede efectuarse en el barco o en el laboratorio).

## Conceptos generales

El protocolo que seguimos es el propuesto por Brussaard (2004). Una aplicación, y el detalle de nuestra adaptación puede verse en Boras et ál. (2009).

## Equipamiento necesario

- Citómetro de Flujo.
- Vórtex.
- Pipetas para dispensado de muestras (2 ml, 10-100 µl).
- Contenedor de nitrógeno líquido.
- Sonicador.
- Baños termostatzados (37 °C y 80 °C).

**Reactivos y material fungible**

- Fijador: glutaraldehído al 25%.
- Crioviales de 2.5 ml.
- Tubos para el citómetro.
- Tinción SybrGreen I (Molecular Probes o Sigma), diluida 10x con agua ultrapura (Sigma).
- Nitrógeno líquido.
- Solución de bolas de poliestireno amarillas de 1  $\mu\text{m}$  a ca.  $10^8 \text{ ml}^{-1}$  (Polysciences).
- Tampón TE.

**Descripción de la técnica****– Recogida de muestra**

- Se toman 2.0 ml de la muestra y se depositan en un criovial. Se fija con 40  $\mu\text{l}$  de glutaraldehído al 25% (0,5% concentración final).
- Dejar fijar durante 10 min en oscuridad.
- Congelar inmediatamente en nitrógeno líquido.
- Almacenar a  $-80^\circ\text{C}$  hasta su análisis.

**– Análisis en el laboratorio**

- Soluciones a preparar con anterioridad:
  - Agua ultrapura (Milli-Q) recientemente preparada.
  - SYBR Green I (Sigma) solución de trabajo en alícuotas y guardada a  $-20^\circ\text{C}$  (200x diluida la solución comercial):
    - a) Dejar la solución comercial a la oscuridad y a la temperatura ambiente.
    - b) Trabajar a luz difusa. El SYBR Green I es muy sensible a la luz.
    - c) Diluir la solución comercial 200 veces en microtubos estériles: 5  $\mu\text{l}$  de la solución stock + 995  $\mu\text{l}$  de agua ultrapura.
    - d) Agua ultrapura prefiltrada y estéril.
    - e) Almacenar a  $-20^\circ\text{C}$ .
    - f) Siempre usar guantes al manipular SYBR Green I.
  - TE buffer (10:1 mM Tris:EDTA):
    - a) primero preparar una solución de 0.5 M EDTA  
18.6 g EDTA + 100 ml de agua ultrapura.

Mientras se mezcla con una barra magnética, ajustar a  $\text{pH}=8$ , añadiendo lentamente NaOH.

- Preparar 10x TE Tris:EDTA (100 mM Tris; 10 mM EDTA), 100 ml de volumen final:  
1.21 g de TRIS + 2 ml de 0.5 M EDTA.

Añadir agua ultrapura hasta 100 ml.

Mientras se mezcla con la barrita magnética, ajustar a pH=8 añadiendo lentamente HCl 1M).

- Preparar 1x TE buffer Tris:EDTA a partir del stock 10x 10 ml 10x TE y 90 ml de agua ultrapura recién preparada y estéril.

**AUTOCLAVAR.** Tener cuidado de marcar todos los viales y botellas a utilizar. Si se ha perdido volumen ajustar con agua ultrapura estéril el volumen perdido.

Filtrar el tampón TE por 0.2  $\mu$ m antes de usarlo.

– **Cómo proceder con el citómetro:**

- Poner en marcha los baños de 80 °C y 37 °C.
  - Descongelar la solución de trabajo de SYBR Green I en oscuridad a temperatura ambiente. Centrifugar 2 minutos.
  - Comprobar los niveles de líquidos del citómetro usaremos agua ultrapura como “sheath fluid”.
  - Limpiar el citómetro: Poner el tubo de ensayo con lejía (diluir al 10% una solución comercial de limpieza) y hacerla correr unos minutos. Cambiar por un tubo de ensayo con agua ultrapura y dejarla correr otros pocos minutos.
- Comprobar con agua ultrapura si el citómetro está limpio.
- escoger las condiciones para virus, que por ejemplo para FACS-Calibur funciona bien con estos ajustes: SSC=625, FL1=530.
- Comprobar si el tampón (TE) utilizado para diluir las muestras está limpio: poner en un tubo 0.5 ml con TE, y hacer correr la muestra. “Los eventos por segundo” normalmente estarán entre 0-15. Si no es así, volver a limpiar el citómetro.
- Comprobar la tasa de flujo del citómetro:
- a) Llenar un tubo con 2-3 ml de tampón TE.
  - b) Pesar la muestra (X0).
  - c) Desmontar el tubo exterior del sistema de inyección. Sacar la vaina exterior y volver a montar la rosca gris.
  - d) Esperar hasta que caiga la gota que se forma en el tubo de aspiración.
  - e) Poner en marcha el temporizador.
  - f) Antes que se forme una nueva gota, colocar el tubo con TE del paso a) en el tubo de aspiración. Simultáneamente iniciar el cronómetro.
  - g) Dejar correr la muestra durante 10-15 minutos a velocidad media (ca. 20  $\mu$ l min<sup>-1</sup>).

- h) Una vez transcurridos este tiempo, sacar inmediatamente el tubo y simultáneamente parar el cronómetro.
- i) Pesar el volumen que queda (X1).
- j) Calcular la tasa de flujo (FR) utilizando la siguiente formula:

$$FR = (X1 - X0) / t$$

donde: t = tiempo (min)

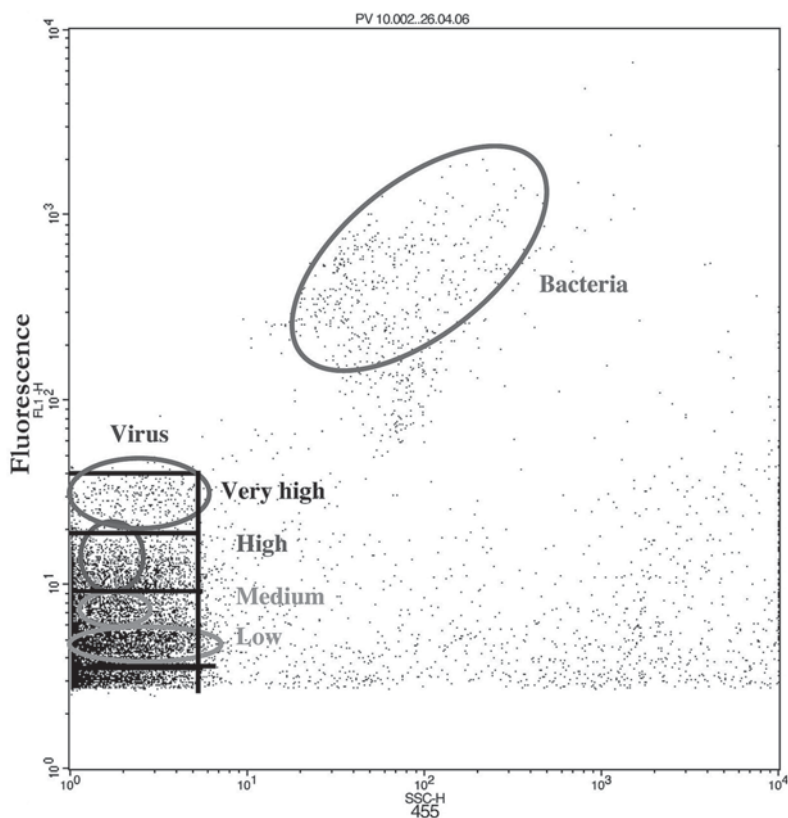
Después de medir la tasa de flujo poner de nuevo la vaina del sistema de inyección, sin olvidar ninguna de las juntas.

- Filtrar la solución autoclavada del tampón TE por filtros de 0.2 µm antes de usar.
- Preparación del Control:
  - Preparar el control (blanco que se restará de las muestras): 0.5 ml de tampón TE filtrado + 5 µl de SYBR Green I, incubar 10 min a 80 °C en el baño termostatzado, y después 5 min más a temperatura ambiente y en oscuridad.
- Pasar el control a velocidad intermedia durante 1 min.
- Anotar el número de eventos contados en la región de virus del citograma. Deberían ser entre 0-45 ev/seg. El valor del control se restará de los recuentos de la muestra.
- Procesamiento de Muestras:
  - Descongelar las muestras (máximo 8 cada vez). Las muestras se descongelan manteniéndolas en la mano o en un baño a ~ 37 °C.
  - El proceso de atemperar la muestra ha de ser rápido, 1-2 minutos para crioviales de 2 ml.
  - La muestra no debería sobrecalentarse.
  - Después de descongelar la muestra la medida de la abundancia de virus ha de ser rápida (la concentración de virus disminuye rápidamente después de descongelarse).
  - Anotar el código de los tubos (número del tubo-código de la muestra).
  - Marcar los tubos de trabajo.
  - Diluir las muestras en tampón TE. Generalmente las diluciones utilizadas para el recuento de virus son: 50-100x en muestras con baja abundancia puede ser necesario usar una dilución menor entre 5-10x.
  - Preparar las diluciones de 50x y 100x en los siguientes pasos:
    - a) Dilution I: 450 µl of TE + 50 µl de muestra (10x).
    - b) Dilution II: 400 µl of TE + 100 µl de "Dilution I" (50x).
    - c) Dilution III: 450 µl of TE + 50 µl de "Dilution I" (100x).
  - Añadir 5 µl de SYBR Green I a cada tubo. Agitar.

- Incubar los tubos 10 min en el baño a 80 °C. Dejarlos 5 minutos en la oscuridad a temperatura ambiente y dejarlos enfriar.
- Mezclar la muestra en el tubo y colocarla en el citómetro.
- Esperar hasta que el voltaje sea estable más o menos 10 segundos. La muestra correrá por 60 s teniendo en cuenta que la media de eventos por segundo debería ser alrededor de 300-600. Nunca debería ser <75 ni >800. Si no es posible alcanzar estos valores, deberemos cambiar la dilución de la muestra.
- Anotar en la plantilla de trabajo después de cada muestra: la velocidad utilizada, el promedio de eventos por seg, el número total de eventos y las condiciones utilizados.

### Cálculo de los resultados

- Análisis de los citogramas: ejemplo de un citograma, donde se pueden llegar a detectar cuatro fracciones de virus y bacterias



La observación de resultados se hace en una gráfica de fluorescencia verde (FL1) contra dispersión lateral de la luz (*side scatter*).

Por ejemplo para un FACSCalibur

- Todos los datos adquiridos en el “BROWSER” se guardan como archivos de Cell Quest. A partir de aquí haremos el “GATING”:
  - a) Abrir un “Plot Model” para virus.
  - b) Abrir el “Inspector” (“Windows”: “Show inspector”). Seleccionar “Analysis” en la ventana “Plot type”. En la ventana “Inspector”, ir a “File” para importar el primer archivo Cell Quest que se quiera analizar.
  - c) En los citogramas, cambiar o preparar regiones nuevas alrededor de las poblaciones que se quieran contar.
  - d) En la “Region” window, marcar cada región con un nombre en “Gates” y escoger un color. (NOTA: para que se puedan ver los colores se ha de seleccionar la caja, “multicolor gates” en la ventana “Inspector”).
  - e) Si aún no se tiene la “statistics region” en el documento, ir a “Statistic” en el “Menu” y abrir una.
  - f) Allí, se pueden editar los estadísticos que se quieran guardar.
  - g) Una vez seleccionadas las regiones, ir a “Acquire”: “Acquisition and Storage” y a “Batch”: “Setup” (seleccionar un archivo para exportar los estadísticos).
  - h) Ir a “Batch” y pulsar “Run”.
  - i) Cuando la nueva muestra está en la pantalla, comprobar si las regiones concuerdan bien y modificar si es necesario. Cuando se termina, seguir con la muestra siguiente.
  - j) Transformar este archivo “Batch” en uno de Excel. Abrir el programa EXCEL y desde allí abrir los archivos y salvarlos como archivos EXCEL.

– Final

- Apagado del citómetro:
  - a) En “Acquire”: “Disconnect from cytometer”.
  - b) “File”: “Quit”, “Do not save”.
  - c) Poner un tubo con agua ultrapura en el citómetro, pulsar “STANDBY” y retirar la presión del contenedor de fluido. NUNCA dejar el tubo en Standby con la presión ON.



### Control de calidad

La media de eventos por segundo debería ser alrededor de 300-600. Nunca debería ser <75 y >800. Si no es posible alcanzar estos valores, deberemos cambiar la dilución de la muestra.

### Referencias

- BORAS, J. A., M. M. SALA, E. VÁZQUEZ-DOMÍNGUEZ, M. G. WEINBAUER, D. VAQUÉ. 2009. «Annual changes of bacterial mortality due to viruses and protists in an oligotrophic coastal environment (NW Mediterranean)». *Environ. Microbiol.* 11: 1181-1193
- BRUSSAARD, C. P. D. 2004. «Optimisation of procedures for counting viruses by flow cytometry». *Appl. Environ. Microbiol.* 70: 1506-1513.



# Determinación de la abundancia y contenido de pigmento de las bacterias fototróficas aeróbicas anoxigénicas

Ferrera, I.

*Institut de Ciències del Mar (CSIC)*

## Finalidad. Campo de aplicación

Se trata de determinar la abundancia de bacterias fototróficas aeróbicas anoxigénicas (AAP) mediante microscopia de epifluorescencia en el infrarrojo y de medir la concentración de su pigmento característico (Bacterioclorofila *a*) en el agua de mar.

Ambos protocolos incluyen dos partes, la recogida de muestras que se realizará a bordo, y el análisis que en ambos casos tiene que efectuarse una vez las muestras lleguen al laboratorio.

## Conceptos generales

Las bacterias fototróficas aeróbicas anoxigénicas (AAP) constituyen un grupo de microorganismos mixotróficos que contienen bacterioclorofila *a* (BChl<sub>a</sub>). Estos organismos, aunque no son capaces de fijar CO<sub>2</sub>, pueden utilizar la luz para generar ATP lo que les podría aportar una ventaja ecológica frente a otros heterótrofos cuando la disponibilidad de C orgánico es limitada (Masin et ál. 2006, Koblízek et ál. 2007, Yurkov et ál. 2008). Sin embargo, su relevancia en el océano no está del todo clara. Durante la expedición Malaspina se recogerán muestras para estudiar la abundancia de estos microorganismos en la capa fótica del océano mediante microscopia de infrarrojo (AAP-DAPIs) y para medir su concentración de BChl<sub>a</sub> mediante HPLC (*High-performance liquid chromatography*). En concreto, se tomarán muestras de 3 m de profundidad y del máximo de clorofila en cada estación.

## AAP-DAPIs:

### Equipamiento necesario:

- Pipetas.
- Sistema de filtración (torre de filtración y bomba de vacío).
- Microscopio de epifluorescencia con cámara y filtros sensibles al infrarrojo.

### Reactivos u otro material fungible

- Pinzas.
- Tubos Falcon de 15 ml.
- Solución de DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol) ( $0.5 \text{ mg ml}^{-1}$ ).
- Aceite de inmersión.
- Formaldehído (37%).
- Filtros de policarbonato blancos de  $0.2 \mu\text{m}$  de tamaño de poro, 25 mm de diámetro.
- Filtros de acetato de celulosa de  $0.8 \mu\text{m}$  de tamaño de poro, 25 mm de diámetro.
- Portaobjetos.
- Cubreobjetos.
- Puntas de pipeta estériles.
- Cajas para guardar portaobjetos.

## Descripción de la técnica

- Se toman 14,5 ml de muestra y se fijan con 0,75 ml de formaldehído 37% (concentración final 2%) en un tubo Falcon de 15 ml. Se guarda la muestra a  $4^\circ\text{C}$  entre 1 y 24 h.
- Pasado el tiempo de fijación, se procede a filtrar la muestra. Primero se pone un filtro de acetato de celulosa de  $0.8 \mu\text{m}$  de tamaño de poro en la torre de filtración que servirá de soporte del filtro de policarbonato.
- Encima del filtro de acetato de celulosa, se pone un filtro de policarbonato negro de  $0.2 \mu\text{m}$  de tamaño de poro. Una vez montados los filtros se coloca la columna de filtración.
- Se agita suavemente la muestra y se añade a la torre de filtración. Se harán dos replicas para cada muestra, en una se filtrarán 5 ml y en la otra 10 ml. Cuando quede 1 ml de muestra por filtrar se añaden 50  $\mu\text{l}$  de la solución de DAPI ( $0,5 \text{ mg ml}^{-1}$ ). Se deja teñir 5 minutos y se acaba de filtrar la muestra.
- Terminada la filtración se pone el filtro sobre un portaobjetos, se añade una gota de aceite de inmersión y se cubre con un cubreobjetos. Se montarán las dos réplicas de una misma muestra en un solo portaobjetos como indica la figura.



- Las muestras se guardan congeladas hasta su posterior análisis en el laboratorio en tierra.
- Una vez en el laboratorio, las muestras se dejan descongelar y se observan en un microscopio de epifluorescencia (Olympus BX51TF) equipado con una objetivo que permita el paso del infrarrojo (Olympus Universal Planapochromat 100×/1,35 OIL IR). El sistema de iluminación necesario consiste en una lámpara de mercurio. El microscopio tiene que estar adaptado con 3 sets de filtros: (1) DAPI, (2) Clorofila, y (3) Infrarrojo.
- Se tomarán 3 imágenes de fluorescencia con una cámara que permita el paso del infrarrojo (B/W CCD camera F-ViewII). Primero, se tomará una imagen en la parte azul del espectro de luz con una exposición de 100–200 ms, para calcular el número total de bacterias (DAPI). Segundo, se tomará una imagen en la parte roja, con 0.5-1 s de exposición para calcular las células que emiten autofluorescencia debido a la clorofila (Chla). Por último, se capturará una imagen en el infrarrojo (3 s exposición) para calcular tanto la presencia de BChla como Chla.
- Mediante un programa de análisis de imagen (Cell F, Olympus) se superponen las tres imágenes para componer una sola. Ésta nos permite distinguir las células que tienen BChla de las que tienen Chla, y obtener recuentos del número total de bacterias, picocianobacterias (Chla) y AAPs (células que emiten en el IR pero no en canal de la Chla).
- Se contarán entre 500-1000 células en un mínimo de 10 imágenes distintas, y teniendo en cuenta el volumen de muestra filtrado y el área de filtro contada se calcula la concentración bacterias totales, picocianobacterias y de AAPs en la muestra original.

### **BChla:**

#### **Equipamiento necesario:**

- Probeta.
- Botella Nalgene de 2L.
- Sistema de filtración (torre de filtración y bomba de vacío).
- Sistema de cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC).

#### **Reactivos u otro material fungible:**

- Pinzas.
- Filtros de fibra de vidrio de 47 mm de diámetro (GF/F).
- Papel aluminio.
- Metanol.
- Acetato de tetrabutilamonio.
- Papel secante.
- Tubos de 5 ml.

## Descripción de la técnica

- Se toma un volumen de muestra de 2 l en una botella Nalgene protegida de la luz directa.
- En una torre de filtración conectada a una bomba de vacío, se colocan dos filtros GF/F de 47 mm en sándwich, es decir, uno encima de otro.
- Se filtran los 2 l de muestra, una vez finalizado se retiran los dos filtros con unas pinzas y se doblan por la mitad con la cara dónde está la biomasa para adentro. Se secan los filtros con papel secante y se envuelven en papel de aluminio. Los filtros se congelan en nitrógeno líquido y se guardan en el congelador a -80 °C hasta su llegada al laboratorio.
- Una vez en el laboratorio, los filtros se dejan descongelar y se extraen en tubos de 5 ml con 3 ml de metanol durante un mínimo de 1 hora.
- El extracto de metanol se inyecta a un sistema de cromatografía líquida de acuerdo con el método descrito por Van Heukelem y Thomas (2001).
- La separación de la muestra se consigue a los 28 min de elución en gradiente de una mezcla de acetato de tetrabutilamonio:metanol (30:70) y metanol al 100%.
- La BChl a se detecta a 770 nm usando un detector con un límite de detección de 0.1 ng l<sup>-1</sup>.

## Referencias

- KOBLÍZEK, M., M. MASIN, J. RAS, A. J. POULTON, O. PRÁŠIL. 2007. «Rapid growth rates of aerobic anoxygenic phototrophs in the ocean». *Environ. Microbiol.* 9: 2401-2406.
- MASIN, M., A. ZDUN, J. STON-EGIERT, M. NAUSCH, M. LABRENZ, V. MOULISOVA, M. KOBLIZEK. 2006. «Seasonal changes and diversity of aerobic anoxygenic phototrophs in the Baltic Sea». *Aquat. Microb. Ecol.* 45: 247-254.
- VAN HEUKELEM L., C. S. THOMAS. 2001. «Computer-assisted high-performance liquid chromatography method development with applications to the isolation and analysis of phytoplankton pigments». *J. Chromatogr. A.* 910: 31-49.
- YURKOV, V., J. T. CSOTONYI. 2008. «New Light on Aerobic Anoxygenic Phototrophs». En: *Advances in Photosynthesis and Respiration*. Springer. Vol. 28, 1: 31-55.

# Medida de Partículas Exopoliméricas Transparentes (TEP) en agua marina

<sup>1</sup>Mazuecos, I. P.; <sup>2</sup>Ortega-Retuerta, E.; <sup>1</sup>Reche, I.

<sup>1</sup> Departamento de Ecología, Universidad de Granada

<sup>2</sup> Laboratoire d'Océanographie Microbienne, Banyuls sur mer, France.

## Finalidad. Campo de aplicación

Protocolo de recogida de muestras de agua marina para el análisis de TEP. Las concentraciones de TEP se determinarán usando el método colorimétrico propuesto por Passow y Alldredge (1995). Los TEP se analizarán en muestras *in vivo*, aunque también pueden ser analizados en muestras fijadas con formol (~ 1% final).

## Conceptos generales

Dentro de las sustancias exopoliméricas, las partículas exopoliméricas transparentes (TEP) son partículas de naturaleza adhesiva, y susceptibles de ser teñidas con azul alcian (Alldredge et ál. 1993). Estas partículas se forman predominantemente por la polimerización abiótica de precursores disueltos, principalmente mono- y polisacáridos de naturaleza ácida. Las TEP son excretadas por microorganismos y tradicionalmente se han asociado a *blooms* de fitoplancton (Passow y Alldredge, 1994; Passow, 2000). Sin embargo, las bacterias también producen TEP, aunque a su vez pueden consumirlas.

De este modo, las TEP contribuyen de forma significativa al flujo descendente de materia orgánica en sistemas marinos, ya que debido a su alta adherencia actúan como una matriz intersticial generando agregados macroscópicos, formados por compuestos orgánicos e inorgánicos que son conocidos como *nieve marina*. La formación y sedimentación de nieve marina es una ruta principal de retirada de carbono de la superficie del océano hacia aguas profundas (Alldredge et ál. 1993, Passow et ál. 2001; Passow, 2002).

### Equipamiento necesario

- Tubo de silicona.
- Botellas Nalgene 2 l (de polipropileno).
- Bomba de vacío.
- Rampa de filtración.
- Kitasato de seguridad (de polipropileno) con tapón perforado para conectar a la bomba.
- Filtros de policarbonato de 0.4  $\mu\text{m}$  de tamaño de poro ( $\varnothing$  25 mm).
- Pinzas para filtros.
- Pipetas de 1 y 5 ml.
- Botes de vidrio de 20 ml o algo similar para la extracción.
- Espectrofotómetro.
- Cubetas desechables de 1 cm.
- Botes de polipropileno para preparar disoluciones de azul alcian.
- Balanza de alta precisión para la preparación de la curva de calibración (precisión de 0.0001 mg).
- Ionizador.
- Vasos de precipitado 500 ml.
- Probeta de 200-500 ml.
- Filtros de jeringa de 0.2  $\mu\text{m}$  de tamaño de poro.
- Jeringas (10 y 20 ml).
- Frasco lavador para el agua ultrapura (Milli-Q).
- Guantes.
- Viales para introducir los filtros.
- Cajas de plástico para almacenar los viales en el congelador.
- Estadillo de recogida de muestras.
- Material de papelería (rotuladores, bolígrafos, lápices...).
- Bandeja.
- Homogeneizador de tejidos para preparar la solución de calibración de goma de xantano.

### Reactivos u otro material fungible

- a) *Tinción*: las TEP se tiñen con azul alcian (conjunto de colorantes básicos polivalentes derivados de la “ftalocianina” que son solubles en agua). En una solución con ácido acético ( $\text{pH} = 2.5$ ), el azul alcian tiñe a los grupos carboxílicos y éster-sulfato de los mucopolisacáridos ácidos, para los cuales es uno de los colorantes catiónicos más ampliamente usado. Las partes teñidas son de color azulado debido a la presencia de cobre en la molécula.



**Reactivos:**

- Solución de azul alcian para la tinción de TEP:
  - a. Azul alcian (0.02 %).
  - b. Ácido acético (0.06 %).

*Preparación de la solución stock de azul alcian* para 50 ml de esta solución: en botes de polipropileno (PET) añadir 0.5 g de azul alcian, seguidamente 1,5 ml de ácido acético y el resto se completa con agua ultrapura hasta 50 ml.

*Preparación de la solución de trabajo de azul alcian:* se diluye la solución anterior 1: 50. Ejemplo: 20 ml de stock + 980 ml de agua ultrapura. Finalmente, con una jeringuilla a través de filtros de 0.2  $\mu\text{m}$  desechables se filtrará la solución de trabajo.

**b) Extracción del azul alcian de los filtros teñidos:****Reactivos:**

- Ácido sulfúrico (80%).

**c) Solución patrón para realizar la curva de calibración:****Reactivos:**

- Goma de xantano (0.1 mg ml<sup>-1</sup>) o ácido algínico, ya que generan partículas similares a las TEP y dan buenos resultados colorimétricos.

*Preparación de la solución de goma de xantano:* pesar aproximadamente 15 – 20 mg de goma de xantano y añadir 200 ml de agua ultrapura. A continuación se pasa la solución por el homogeneizador (con tres o cuatro pasadas de pistón se obtendrá una disolución homogénea de la goma de xantano). Se deja reposar a ~ 4 °C, y se vuelve a pasar otra vez por el homogeneizador.

**Calibración**

*Curva de calibración de goma de xantano (y/o ácido algínico):* Con la solución de goma de xantano (y/o ácido algínico) se calculará la concentración exacta filtrando volúmenes conocidos (e. g. 1, 2, 4, y 8 ml) a través de filtros de policarbonato de 0.4  $\mu\text{m}$  de tamaño de poro, que se pesarán antes y después (al menos 3 veces) de la filtración. De igual modo, se filtrarán volúmenes semejantes (e. g. 1, 2, 4, y 8 ml) de solución patrón de goma de xantano para teñir los filtros con azul alcian y se leerá la absorbancia del extracto obtenido a 787 nm. Por último, con la relación de la ab-

sorbancia a 787 nm y los µg de goma de xantano (obtenidos con la diferencia de pesadas antes y después de filtrar) se realizará la curva de calibración.

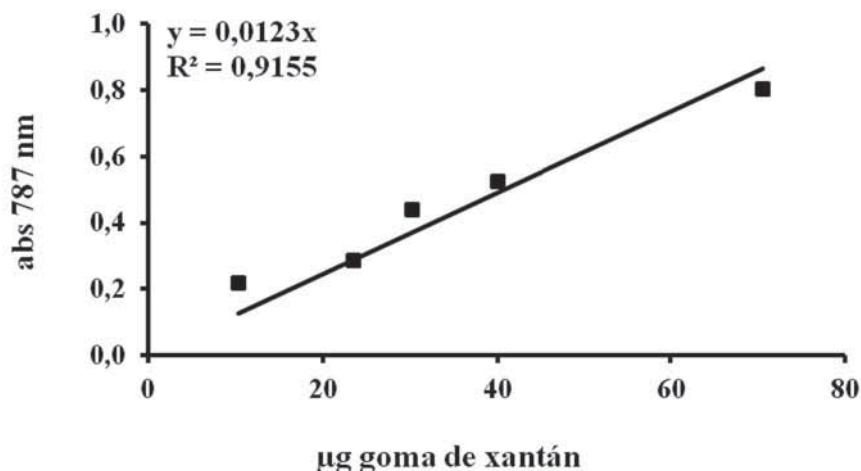


Figura 1. Ejemplo de curva de calibración absorbancia 787 nm vs µg de goma de xantano.

## Descripción de la técnica

Pasos a seguir:

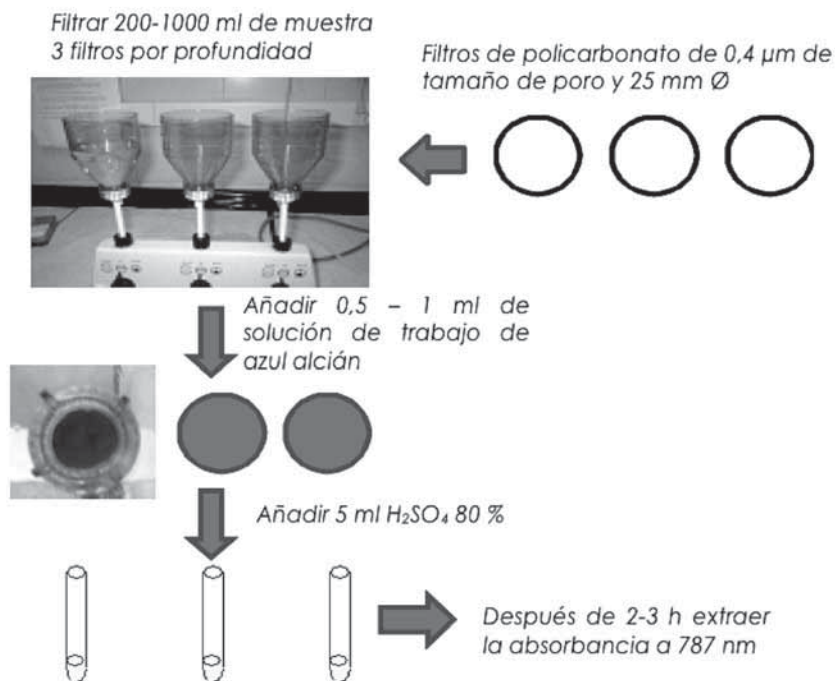
- Preparación de solución de trabajo de azul alcian.
- Recoger el agua en botellas Nalgene de 2 l para cada muestra.
- Filtrar 200-1000 ml de muestra (según saturación del filtro) a través de filtros de policarbonato de 0,4 µm de tamaño de poro. Tres filtros (réplicas) por profundidad. Usar una presión no muy alta (~ 150 mm de Hg) con ritmo constante.
- Tinción: Teñir el filtro con 0,5 – 1 ml de solución de trabajo de azul alcian (que lo cubra completamente). Dejar unos 5 segundos. Filtrar la solución de azul alcian y enjuagar con agua ultrapura filtrada por 0,2 µm.

*Nota:* en este paso los filtros podrían ser congelados durante más de 6 meses a -20 °C o -80 °C (Passow y Alldredge, 1995).

Por último, los filtros teñidos con azul alcian se colocarán en tubos de ensayo y se añadirá 5 ml de  $H_2SO_4$  al 80% para la extracción. El extracto se agitará al menos un par de veces para facilitar la extracción. Y después de 2-3 h se leerá la absorbancia de dicho extracto a 787 nm usando cubetas desechables.

## Esquema y cuadro sinóptico de la técnica

### Filtración y tinción de TEP



### Cálculo de los resultados

La curva de calibración nos permite calcular el factor de calibración (que es la inversa de la pendiente de la curva que obtuvimos en el apartado de calibración). Con este factor de calibración junto con el volumen (L) filtrado de muestra y los datos de absorbancia (a 787 nm) obtenidos anteriormente podremos calcular la concentración de partículas exopoliméricas transparentes ( $C_{TEP}$ ) expresadas como µg de equivalentes de goma de xantano (XG) por litro (µg XG eq L<sup>-1</sup>):

$$C_{TEP} = (A_{muestra} - A_{blanco}) V^{-1} F$$

Donde  $A_{muestra}$  es la absorbancia de la muestra,  $A_{blanco}$  es la absorbancia del blanco, V el volumen filtrado de muestra y F es el factor de calibración. El factor de calibración F se calcula de la siguiente forma:

$$F = W \times [(A_{787} - C_{787}) \times V^{-1}]^{-1}$$

Donde F es el factor de calibración, W es la concentración de la solución de goma de xantano en  $\mu\text{g l}^{-1}$ ,  $A_{787}$  es la absorbancia del extracto a 787 nm,  $C_{787}$  es la absorbancia del blanco y V es el volumen filtrado en l.

## Control de calidad

Al inicio de cada grupo de muestras hacer un blanco filtrando agua ultrapura y tiñendo igual que el resto de las muestras. El valor de absorbancia (787 nm) de los blancos será sustraído al valor total de la absorbancia de las muestras, para eliminar la capacidad del azul alcian de teñir el filtro vacío. Después de un mes de uso de la solución de azul alcian, preparar otra solución nueva debido a que podría haber perdido parte de su capacidad de tinción. El límite de detección del método es de  $2.2 \mu\text{g XG eq l}^{-1}$  y el coeficiente de variación es de 13%.

## Referencias

- ALLDREDGE, A. L., U. PASSOW, B. E. LOGAN. 1993. «The abundance and significance of a class of large, transparent organic particles in the ocean». *Deep-sea Res. I.* 40: 1131-1140.
- PASSOW, U., A. L. ALLDREDGE. 1995. «A dye-binding assay for the spectrophotometric measurement of transparent exopolymer particles (TEP)». *Limnol. Oceanogr.* 40: 1326-1335.
- 1994. «Distribution, size and bacterial colonization of transparent exopolymer particles (TEP) in the ocean». *Mar. Ecol. Progr. Ser.* 113: 185-198.
- PASSOW, U. 2000. «Formation of transparent exopolymer particles, TEP, from dissolved precursor material». *Mar. Ecol. Progr. Ser.* 192: 1-11.
- 2002a. «Production of transparent exopolymer particles (TEP) by phyto- and bacterioplankton». *Mar. Ecol. Progr. Ser.* 236: 1-12.
- 2002b. «Transparent exopolymer particles (TEP) in aquatic environments». *Progr. Oceanogr.* 55: 287-333.
- PASSOW, U., R. F. SHIPE, A. MURRAY, D. K. PAK, M. A. BRZEZINSKI, A. L. ALLDREDGE. 2001. «The origin of transparent exopolymer particles (TEP) and their role in the sedimentation of particulate matter». *Cont. Shelf Res.* 21: 327-346.

# Concentración de biomasa de picoeucariotas, bacterias y virus marinos para la extracción de ácidos nucleicos

<sup>1</sup>Arrieta, J. M.; <sup>2</sup>Acinas, S. G.; <sup>2</sup>Massana, R.; <sup>2</sup>Vaqué, D.

<sup>1</sup>*Instituto Mediterráneo de Estudios Avanzados (UIB-CSIC)*

<sup>2</sup>*Institut de Ciències del Mar (CSIC)*

## Finalidad. Campo de aplicación

La finalidad de este proceso es la obtención de biomasa microbiana para la extracción de ácidos nucleicos (ADN y ARN) que serán utilizados posteriormente para diferentes análisis moleculares y genómicos.

## Conceptos generales

Los microorganismos median procesos críticos para el funcionamiento de los ecosistemas marinos y comprenden la mayor parte de la biomasa presente en los océanos. También sabemos que las bacterias marinas (y en general los microorganismos marinos) encierran una enorme diversidad, pero por su pequeño tamaño, resulta imposible distinguirlos por su morfología. Es por esto que desde los inicios de la microbiología, se han usado otros criterios para su identificación como la capacidad de metabolizar determinados compuestos. Estas técnicas clásicas de identificación requieren el establecimiento de cultivos puros, y dado que la mayor parte de las bacterias marinas no pueden cultivarse aún, no son adecuadas para determinar la diversidad de una muestra natural. Actualmente los métodos preferidos para determinar la diversidad de las comunidades procarióticas marinas se basan en la determinación de diferencias en la secuencia de uno o más genes, normalmente el gen del ARN ribosómico 16S.

De forma similar, la estructura de las comunidades de picoeucariotas o virus se basa en análisis moleculares adaptados para estos grupos.

Por otro lado el análisis del ARN presente en una muestra de agua natural puede dar importantes indicaciones sobre la actividad de los microorga-

nismos presentes. Dada su corta vida, el ARN mensajero refleja la expresión genética en tiempo real, de esta manera se puede identificar la actividad de determinados genes asociados a procesos de interés biogeoquímico y en algunos casos la identidad de los microorganismos implicados. El ARN ribosómico también puede utilizarse como indicador de los procariotas o protistas potencialmente más activos a nivel metabólico. Además del análisis de un gen o genes, en Malaspina también abordaremos una estrategia genómica mediante la realización del metagenoma (secuenciación parcial de todos los genes presentes en una comunidad microbiana) y del metatranscriptoma para ver la diversidad funcional de dicha comunidad.

### Equipamiento necesario

Se usarán dos sistemas diferentes de filtración:

#### SISTEMA DE FILTRACIÓN PARA PEQUEÑOS VOLÚMENES

El sistema de filtración consiste de una bomba peristáltica y una línea de filtración para cada muestra. Para agilizar el proceso, existen sistemas que permiten procesar varias muestras en paralelo como el que utilizamos en la Expedición Malaspina. Cada línea de filtración está equipada con dos filtros, el primero (más cercano a la bomba) es de policarbonato (PC) de 3  $\mu\text{m}$  de tamaño de poro donde recogeremos los picoeucariotas. Y el siguiente, de PC de 0.22  $\mu\text{m}$  de tamaño de poro donde se recogerán los procariotas. Obviamente, es muy importante mantener este orden, pero es uno de los errores más fáciles de cometer. Utilizaremos este sistema para filtrar un máximo de 20-25 litros de agua de mar. Este sistema se utiliza para concentrar la biomasa microbiana y su posterior extracción de DNA para posteriores análisis dependiente de PCR (genotecas ambientales, ARISA, T-RFLPs, etc.).

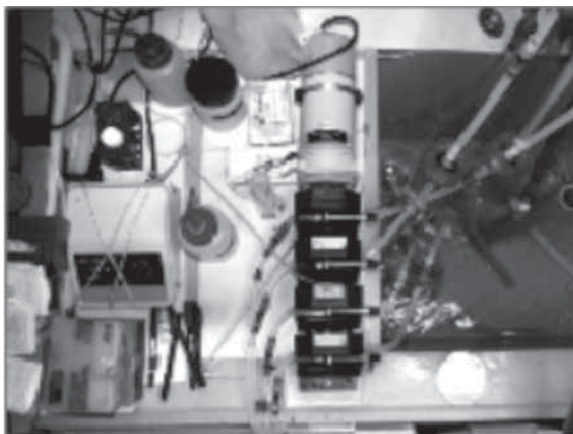


Figura 1. Sistema de filtración para pequeños volúmenes.

### SISTEMA DE FILTRACIÓN PARA GRANDES VOLÚMENES

Usaremos este sistema para recolectar grandes volúmenes de muestra (hasta 100 l o más) para metagenómica (metaG) y también para el muestreo rápido de ARN para realizar screening funcional y metatranscriptómica (metaT). También utilizaremos este sistema para la recolección de virus precipitados con  $\text{FeCl}_3$ . Este sistema consta de una bomba peristáltica y dos soportes de filtración de 142 mm de diámetro.

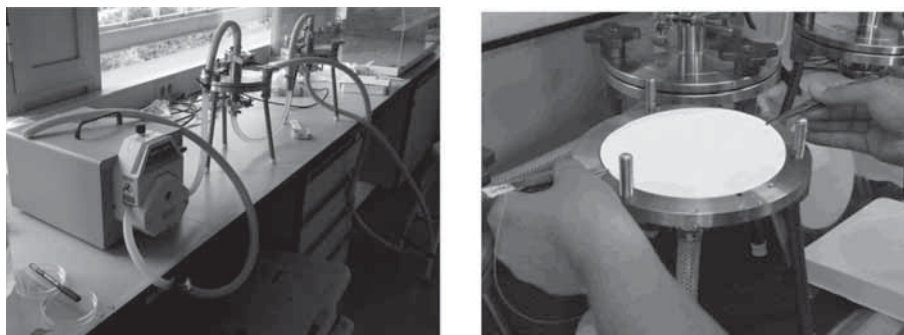


Figura 2. Sistema de filtración de grandes volúmenes.

### Reactivos u otro material fungible

#### *Material de plástico:*

- 12 Garrafas de 20 l. Para la toma de muestras de ADN para metagenómica.
- 4 Garrafas de 10 l y 4 de 20 l: Para las muestras de ADN/ARN de pequeño volumen y concentrado de virus (20 l).
- Puntas de pipeta, tubos de centrifuga de 2, 15 y 50 ml.

#### *Filtros:*

##### **Picoeucariotas y procariotas:**

##### **1) Para el sistema de filtración de pequeño volumen:**

- filtros de polycarbonato de 47 mm de diámetro y 3  $\mu\text{m}$  de tamaño de poro.
- filtros de polycarbonato de 47 mm de diámetro y 0.22  $\mu\text{m}$  de poro.

##### **2) Para el sistema de filtración de gran volumen:**

- Filtros de polycarbonato de 142 mm de diámetro y 3  $\mu\text{m}$  de poro.

- Filtros de Millipore Express de 142 mm de diámetro y 0.22  $\mu\text{m}$  de poro.
- Filtros de policarbonato de 142 mm de diámetro y 0.8  $\mu\text{m}$  de poro.
- Filtros de policarbonato de 142 mm de diámetro y 0.22  $\mu\text{m}$  de poro.

#### Concentración de Virus:

- Filtros de policarbonato de 142 mm de diámetro y 1  $\mu\text{m}$  de poro
- Filtros de soporte Pall Supor-800 filter (cat.no.60114; 142 mm, 0.8  $\mu\text{m}$ ).

#### Reactivos:

- RNALater™ : Solución comercial (Ambion).
- Solución de  $\text{FeCl}_3$  para la precipitación de virus.  
(Protocolo de John et ál. 2011)

Solución stock 10 g  $\text{Fe l}^{-1}$

$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  (FW=270,3) 4.83 g

Q-water 100 ml

Preparar en tierra y almacenar a 4 °C o temperatura ambiente.

#### Descripción de la técnica

El proceso a bordo consiste fundamentalmente en recolectar biomasa por filtración, los protocolos difieren según la cantidad de muestra disponible y el uso final que se vaya a dar a la biomasa recolectada.

Todo el material en contacto con la muestra (garrafas, tubos del sistema de filtración, portafiltros etc) se desinfectará entre diferentes usos con una solución de lejía (10% de la solución comercial) aclarando posteriormente con un pequeño volumen de muestra. Se evitará el contacto directo de cualquier superficie no desinfectada de esta manera con la muestra de agua. Las manos, aún con guantes no deberían entrar en contacto directo con la muestra en ningún caso.

#### FILTRACIÓN PARA RNA SCREENING FUNCIONAL (12 I) Y METATRSCRIPTÓMICA (METAT)

Es esencial trabajar muy rápido para evitar cambios en los patrones de transcripción. Las muestras dedicadas a la extracción de ARN serán procesadas SIEMPRE en primer lugar y se mantendrán en una nevera con hielo en todo momento. Idealmente no deberían transcurrir más de 10-15 minutos entre la toma de la muestra y el final del proceso de filtración.



**Procedimiento**

- Tomar las muestras de la roseta, utilizando una malla de 200  $\mu\text{m}$  a la salida de la botella.
- Ajustar una malla de 20  $\mu\text{m}$  en el tubo de toma de muestra del sistema de filtración de grandes volúmenes. Colocar un filtro de policarbonato de 142 mm de diámetro y 3  $\mu\text{m}$  de tamaño de poro en el portafiltros más cercano a la bomba peristáltica y otro filtro (Millipore Express plus) de 142 mm de diámetro y 0.22  $\mu\text{m}$  de tamaño de poro en el siguiente portafiltros. Para las filtraciones de RNA de las estaciones en donde se realicen el metagenoma los filtros para metaT son los mismos que para metaG: PC de 0.8  $\mu\text{m}$  de poro y PC 0.22  $\mu\text{m}$  de poro.
- Comenzar la filtración purgando el aire del sistema mediante los tornillos de purga de ambos portafiltros.
- Filtrar la muestra tan rápido como sea posible, pero manteniendo la presión por debajo de los 13-15 psi, tiempo máximo de filtración 15 min.
- Recoger el volumen filtrado en una garrafa limpia para la concentración de biomasa vírica.

**Volumen de filtración:** filtrar 12 litros de muestra durante 15 minutos como máximo. Si queda muestra sin filtrar después de 15 minutos, parar, anotar el volumen filtrado y proceder al paso siguiente.

- Guardar los filtros por separado en tubos de 10 o 15 ml (filtros de policarbonato) o de 50 ml (Express Filters) convenientemente identificados, congelar por inmersión en nitrógeno líquido y almacenar a 80 °C.

**TOMA DE MUESTRAS DE ADN DE PERFILES DE LA ROSETA (12 D)**

Aquí el objetivo es recuperar una cantidad suficiente de biomasa para ser utilizada en técnicas que dependen de la amplificación por PCR, por ello tomaremos un volumen relativamente pequeño de agua e intentaremos procesar un número mayor de muestras, para ello utilizaremos el sistema de filtración de pequeños volúmenes que nos permite procesar cuatro muestras en paralelo.

**Procedimiento:**

- Tomar las muestras de la roseta y mantener en hielo o en nevera hasta el momento de la filtración. La prioridad son las muestras de ARN, pero la filtración de estas muestras no debería demorarse más de un par de horas.
- Preparar el sistema de bombeo con una malla de 20  $\mu\text{m}$  en la entrada el tubo, un filtro de policarbonato de 3  $\mu\text{m}$  de poro en el portafiltros más cercano a la bomba peristáltica y otro de 2  $\mu\text{m}$  de poro en el siguiente portafiltros.

- Comenzar la filtración purgando el aire del sistema mediante los tornillos de purga de ambos portafiltros.
- Mantener la tasa de filtración a unos 50-100 ml min<sup>-1</sup> (puede llevar una hora).

**Volumen de filtración:** cuando la tasa de filtración se ralentice, cambiar el filtro de 3 µm, si no mejora, anotar el volumen filtrado y parar la filtración. Si has usado más de un filtro de 3 µm, guárdalos juntos en el mismo criovial.

- Guardar los filtros por separado (0.22 µm y 3 µm) en crioviales de 2 ml convenientemente identificados, congelar por inmersión en nitrógeno líquido y almacenar a -80 °C.

### FILTRACIÓN DE ADN PARA METAGENÓMICA (120-240 l)

El principal objetivo aquí es recuperar la mayor cantidad de biomasa de procariotas y picoeucariotas que podamos. Dado que las abundancias en las capas profundas del océano son muy bajas, necesitaremos al menos 100 l de muestra para obtener una cantidad suficiente de ADN.

#### Procedimiento:

- Tomar las muestras de la roseta, utilizando una malla de 200 µm a la salida de la botella, se tomarán ≥100 l de muestra siempre que sea posible. Como no es posible comenzar la filtración inmediatamente ya que primero hay que filtrar las muestras de ARN para metatranscriptómica, se intentará mantener las muestras en hielo o en la nevera.
- Ajustar una malla de 20 µm en el tubo de toma de muestra del sistema de filtración de grandes volúmenes. Colocar un filtro de policarbonato de 142 mm de diámetro y 0.8 µm de tamaño de poro en el portafiltros más cercano a la bomba peristáltica y otro filtro (Millipore Express plus) de 142 mm de diámetro y 0.22 µm de tamaño de poro en el siguiente portafiltros. Tener en cuenta que los 0.22 µm de Millipore Express Filter y los de policarbonato de 0.22 µm SON DISTINTOS y se usan para análisis distintos.
- Comenzar la filtración purgando el aire del sistema mediante los tornillos de purga de ambos portafiltros.
- Filtrar la muestra tan rápido como sea posible, pero manteniendo la presión por debajo de los 13-15 psi. Si la tasa de filtración disminuye, cambiar de filtros (máximo dos filtros de cada tamaño de poro por muestra). Los filtros del mismo tamaño de poro se almacenan juntos en el mismo tubo de 15 ml. Para los filtros Express Filter guardarlos en un tubo de 50 ml.
- Recoger el volumen filtrado en varias garrafas limpias para la concentración de biomasa vírica.

**Volumen de filtración:** en algunas estaciones habrá  $\approx 248$  l disponibles, lo cual será suficiente para hacer dos réplicas. Comprobar y anotar el volumen filtrado.

- Guardar los filtros por separado en tubos de 10 -15 ml (filtros de polycarbonato) o de 50 ml (Express Filters) convenientemente identificados. Congelar inmediatamente en nitrógeno líquido y almacenarlos a  $-80^{\circ}\text{C}$  (no hace falta añadir RNA later). Los criotubos de 10 ml que contienen los filtros de  $0.8\ \mu\text{m}$  se congelan por inmersión en nitrógeno líquido y se almacenan a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

**IMPORTANTE:** el filtrado se utilizará posteriormente para la concentración de virus, por tanto se almacenará en garrafas limpias de 20 l.

### CONCENTRACIÓN DE VIRUS PARA METAGENÓMICA

Esta técnica toma como punto de partida el agua filtrada de las muestras de metagenómica de procariotas. Este agua, que ya ha sido filtrada por  $0.22\ \mu\text{m}$ , contiene la mayor parte de los virus. Para acelerar el proceso de filtración, precipitaremos primero los virus utilizando una solución de  $\text{FeCl}_3$  y recuperaremos el precipitado por filtración utilizando el sistema de filtración de grandes volúmenes.

#### Procedimiento:

- Tomar 80 l (cuatro garrafas de 20 l) de agua filtrada por  $0.22\ \mu\text{m}$  procedentes de la filtración para metagenómica.
- Añadir 2 ml de la solución de  $\text{FeCl}_3$  y agitar vigorosamente.
- Dejar reposar durante al menos una hora a temperatura ambiente (o toda la noche a  $4^{\circ}\text{C}$ ).
- Filtrar utilizando el sistema de filtración de grandes volúmenes. En este caso se utilizará solo un porta filtros equipado con dos filtros, primero pondremos un filtro de soporte (Pall Suppor 142 mm diámetro,  $0.8\ \mu\text{m}$  tamaño de poro) y directamente encima de este un filtro de 142 mm de polycarbonato y  $1\ \mu\text{m}$  de tamaño de poro.
- El precipitado se acumulará sobre el filtro de polycarbonato. Cuando baje la velocidad, se cambiará solo el filtro de polycarbonato (no es necesario cambiar el filtro de soporte) y se almacenará en un tubo de centrífuga de 50 ml teniendo especial cuidado de no perder nada del precipitado. Serán necesarios unos tres filtros por cada 20 l, que se pueden almacenar juntos en el mismo tubo, en total cuatro tubos conteniendo 3 filtros cada uno. **Los tubos conteniendo los filtros con el precipitado se almacenarán a  $4^{\circ}\text{C}$ .**
- Es muy importante limpiar bien (con agua) todos los restos de precipitado al acabar la filtración, ya que si no se hace quedarán manchas muy difíciles de limpiar al día siguiente.

**Volumen de filtración:** 80 l de agua prefiltrada por  $0.22\ \mu\text{m}$ .

Cuadro sinóptico de la técnica

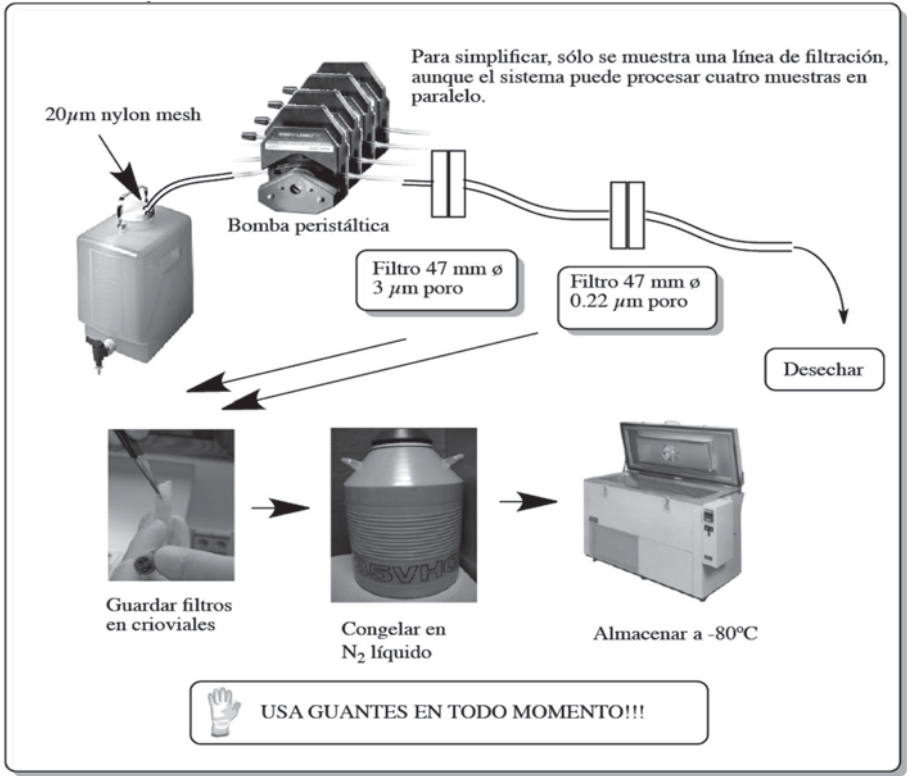


Figura 3. Filtración ADN de pequeños volúmenes.

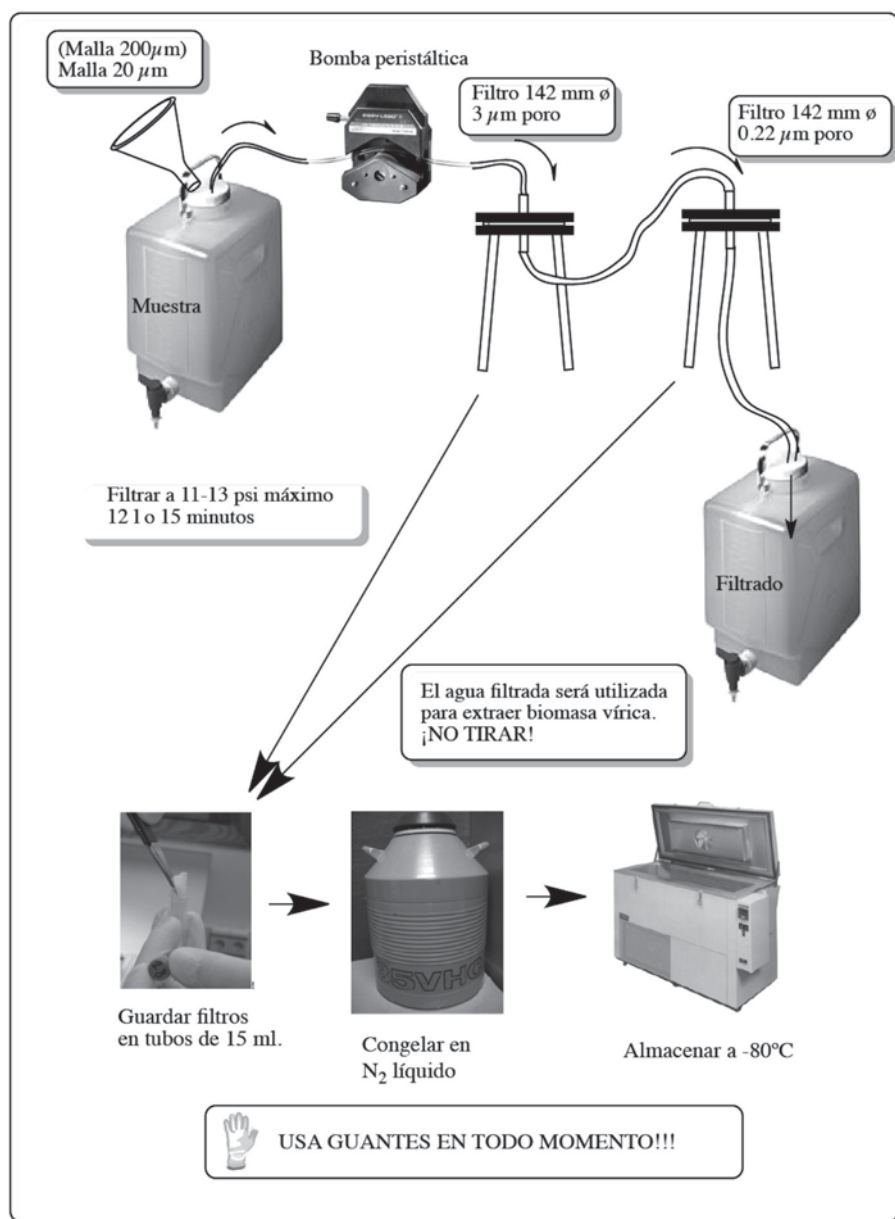


Figura 4. Filtración ARN para metatranscriptómica.

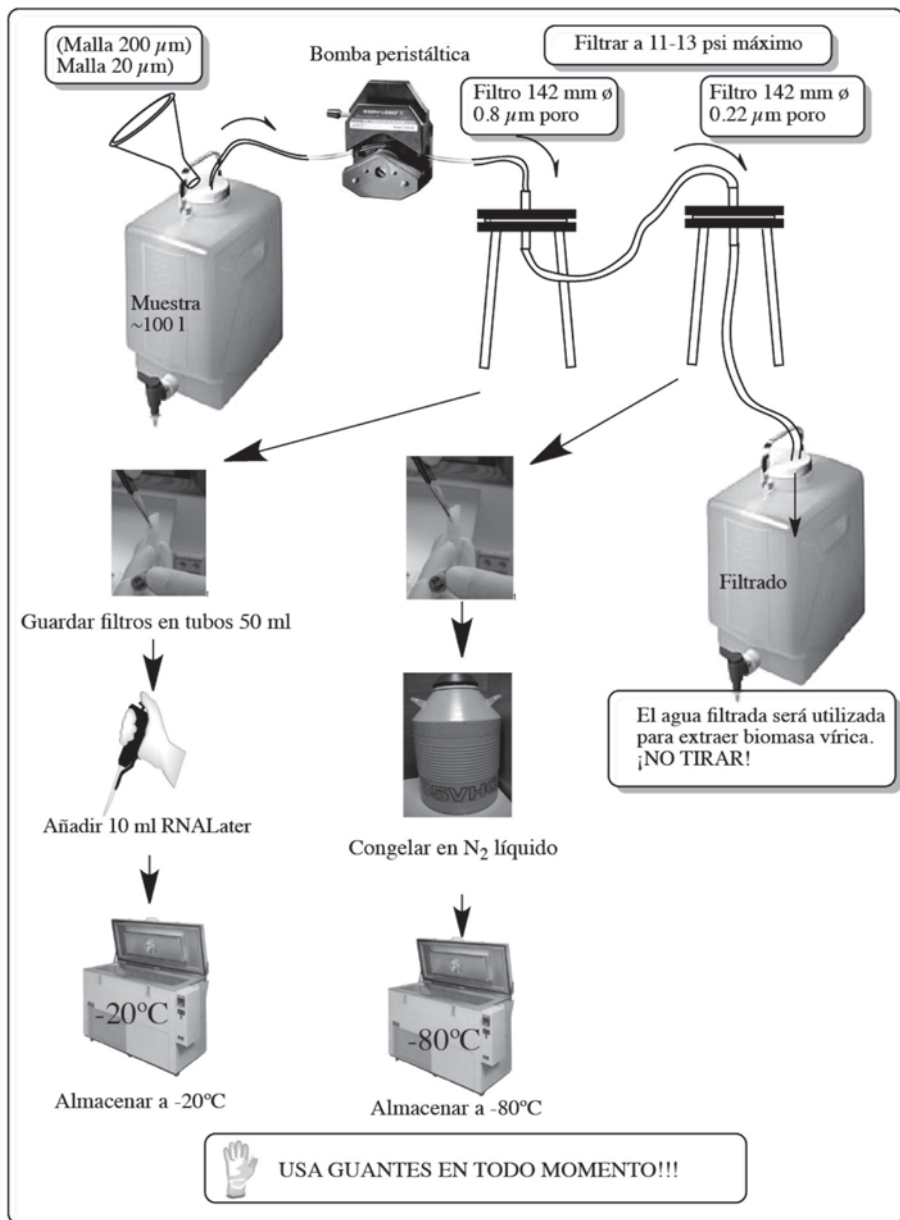


Figura 5. Filtración ADN para metagenómica (utilizar express Plus Filter de 0.22  $\mu\text{m}$ ).

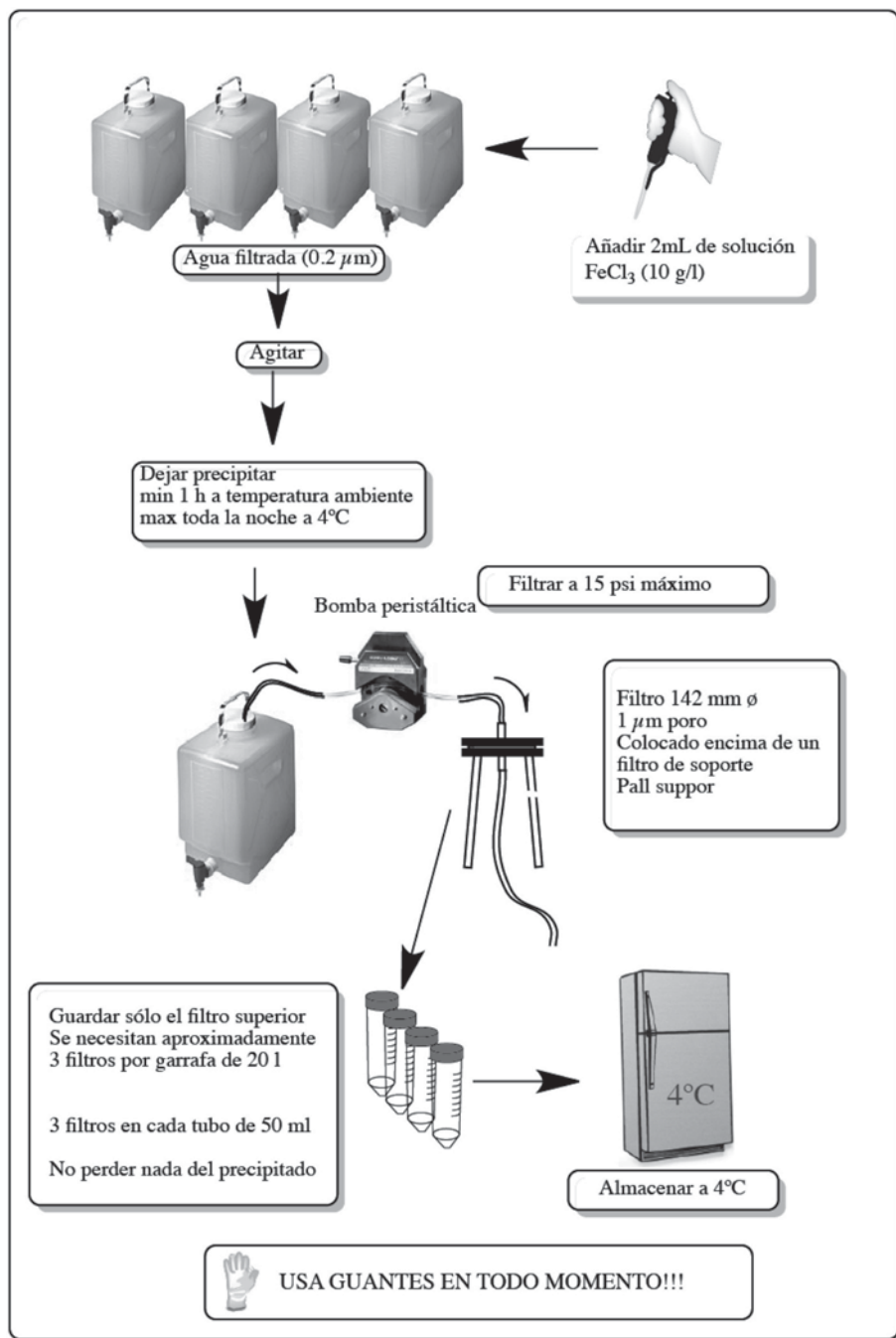


Figura 6. Concentración de virus para metagenómica.

## Control de calidad

Es importante tener un volumen suficiente de muestra que garantice una cantidad mínima de ADN/ARN. Se necesitarán al menos 12 litros para técnicas de huella genética (fingerprinting) y técnicas basadas en PCR. Para metagenómica serán necesarios un mínimo de 100 l.

## Referencias

- ACINAS, S. G., F. RODRÍGUEZ-VALERA, C. PEDRÓS-ALIÓ C. 1997. «Spatial and temporal variation in marine bacterioplankton diversity as shown by RFLP fingerprinting of PCR amplified 16S rDNA». *FEMS Microbiol. Ecol.* 24: 27-40.
- ACINAS, S. G., J. ANTÓN, F. RODRÍGUEZ-VALERA. 1999. «Diversity of Free-living and Attached Bacteria in Offshore Western Mediterranean Waters as depicted by Analysis of Genes Encoding 16S rRNA». *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 514-522.
- JOHN, S. G., C. B. MENDEZ, L. DENG, B. POULOS, A. K. M. KAUFFMAN, S. E. KERN, J. BRUM, M. F. POLZ, E. A. BOYLE, M. B. SULLIVAN. 2011. «A simple and efficient method for concentration of ocean viruses by chemical flocculation». *Environ. Microbiol. Reports* 3: 195-202.
- MASSANA, R., A. E. MURRAY, C. M. PRESTON, E. F. DELONG. 1997. «Vertical distribution and phylogenetic characterization of marine planktonic *Archaea* in the Santa Barbara Channel». *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 50-56.
- MOESENEDER, M. M., J. M. ARRIETA, G. MUYZER, C. WINTER, G. J. HERNDL. 1999. «Optimization of terminal-restriction fragment length polymorphism analysis for complex marine bacterioplankton communities and comparison with denaturing gradient gel electrophoresis». *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 3518-3525.



# Incorporación de bromodeoxiuridina en ADN microbiano para la detección de filotipos activos

Arrieta, J. M.; García-Zarandona, I.

*Instituto Mediterráneo de Estudios Avanzados (UIB-CSIC)*

## Finalidad. Campo de aplicación

El objetivo de esta técnica es el marcaje de microorganismos en crecimiento activo, es decir capaces de replicar su ADN. Para ello se introduce un análogo de la timidina (Bromodeoxiuridina) que será incorporado en lugar de esta durante la replicación del ADN. La bromodeoxiuridina incorporada en el ADN puede ser detectada posteriormente utilizando anticuerpos específicos, que a su vez pueden ser unidos a un soporte paramagnético de forma que el ADN sintetizado durante el experimento puede ser inmovilizado mediante el uso de un soporte magnético. De esta manera se puede purificar el material genético de los microorganismos que replicaron su ADN durante el experimento de marcaje y para su posterior identificación.

## Conceptos generales

Dado que la finalidad última es la detección de los microorganismos activos en la muestra, el proceso de incubación ha de comenzarse inmediatamente, manteniendo las muestras a una temperatura lo más cercana a la original en todo momento. El proceso es sencillo, consiste en añadir bromodeoxiuridina a las muestras en una concentración final 40 nM, incubar las muestras a la temperatura original a la que se tomó la muestra y finalmente recolectar la biomasa utilizando los mismos sistemas de filtración que se utilizarán para la recolección de ADN o ARN.

La bromodeoxiuridina es un mutágeno potencial, como la mayoría las sustancias que interactúan de alguna manera con el ADN. Las rutas de entrada en el cuerpo son la respiración del producto en polvo y la ingestión.

Para prevenir la exposición accidental será suficiente con utilizar guantes y bata y mantener las precauciones habituales a la hora de trabajar en el laboratorio (no comer ni beber). También es importante mantener el área de trabajo limpia, limpiando los derrames accidentales con papel absorbente seguido de agua y jabón.

### Equipamiento necesario

- Contenedor de plástico para mantener la muestra durante la incubación (5 l).
- Incubador(es), tantos como temperaturas diferentes se muestreen a la vez.
- Bomba peristáltica con filtros en línea.
- Contenedor para residuos.

### Reactivos u otro material fungible

Para el marcaje de ADN.

- Filtros de policarbonato de 47 mm de diámetro.
  - 3.0  $\mu\text{m}$  de tamaño de poro.
  - 0.22  $\mu\text{m}$  de tamaño de poro.
- Solución de bromodeoxiuridina (10 mM). Almacenada a -20 °C a largo plazo (meses) o a 4 °C a corto plazo (días).
- Guantes.

Para la purificación de ADN marcado.

- Tampón PBS (Sigma P-4417).
- ADN de esperma de arenque.
- Anticuerpos Anti-BrdU (bromodeoxiuridina) marcados con biotina.
- Seroalbúmina Bovina (BSA) calidad biológica molecular.
- Bolitas paramagnéticas recubiertas de estreptavidina.
- Separador magnético.
- Pipetas y puntas con filtro.
- Guantes.

## Descripción de la técnica

### *Incorporación de bromodeoxyuridina (in situ)*

#### 1. Preparación del material.

Todo el material en contacto con la muestra se limpia primero con agua destilada para eliminar restos de sal y después por inmersión en una solución de lejía (10% de la solución comercial) durante al menos 30 minutos.

Justo antes del muestreo se eliminan los restos lejía enjuagando con un pequeño volumen de muestra.

#### 2. Toma de muestras.

La toma de muestras se hará directamente de la válvula de la botella del CTD o utilizando un tubo de silicona previamente tratado con lejía como se describe en el punto 1. Las muestras se deben mantener en todo momento a la temperatura original para evitar cambiar el ritmo de crecimiento de las poblaciones microbianas. Para muestras de superficie hasta aproximadamente 100 m será suficiente con 2 l de muestra. Para muestras más profundas es conveniente filtrar al menos 5 l dado que la abundancia de biomasa es mucho menor.

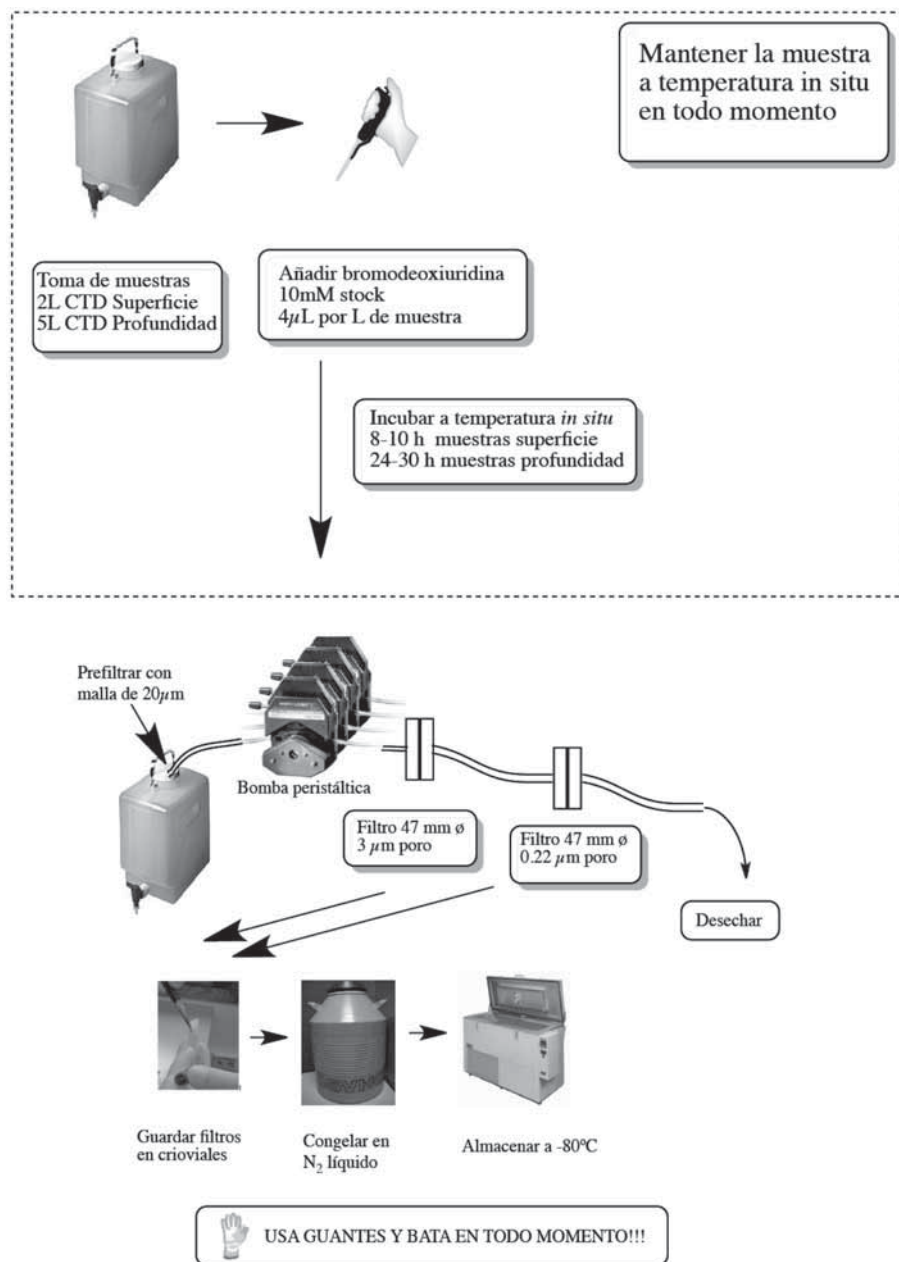
3. Después de tomar la muestra, y tan rápido como sea posible, se añadirá la bromodeoxyuridina a una concentración final de 40 nM. (4  $\mu$ L por litro de muestra). Las muestras se incuban a la temperatura original durante 8-10 h en el caso de muestras de superficie (hasta 100 m) y durante 24-30 h en el caso de las muestras de profundidad. No es necesario ser extremadamente preciso con los tiempos, ya que no es una técnica cuantitativa, pero en cualquier caso anotaremos el tiempo real de incubación en el cuaderno de laboratorio.
4. Una vez transcurrido el tiempo de incubación se procederá a filtrar las muestras utilizando el sistema de filtración secuencial descrito para la toma de muestras de ADN.
5. Preparar el sistema de bombeo con una malla de 20  $\mu$ m en la entrada el tubo, un filtro de policarbonato de 3  $\mu$ m de poro en el portafiltros más cercano a la bomba peristáltica y otro de 2  $\mu$ m de poro en el siguiente portafiltros.
6. Comenzar la filtración purgando primero el aire del sistema de forma que se utilice toda la superficie útil del filtro.
7. Mantener la tasa de filtración a unos 50-100 ml min<sup>-1</sup>.
8. Cuando la tasa de filtración se ralentice, cambiar el filtro de 3  $\mu$ m. Si no mejora, cambia también el de 0.22  $\mu$ m. Si se usa más de un filtro del mismo tamaño de poro se guardarán juntos en el mismo criovial (ver siguiente paso).

9. Guardar los filtros por separado (0.22  $\mu\text{m}$  y 3  $\mu\text{m}$ ) en 2 crioviales de 2 ml convenientemente identificados, congelar por inmersión en nitrógeno líquido y almacenar a -80 °C.

### *Purificación de ADN marcado (en el laboratorio)*

1. Extraer el ADN de los filtros (muestra) usando la técnica clásica del fenol-cloroformo o un kit comercial y cuantificar el extracto.
2. Preparar una solución de ADN de esperma de arenque de 1.25 mg/ml en PBS.
3. Hervir esta solución durante un minuto y enfriarla inmediatamente en hielo.
4. Diluir la solución comercial de anticuerpos 1:10 en PBS (sólo la cantidad necesaria para las muestras que se vayan a procesar ese día, se necesitará 1  $\mu\text{l}$  por muestra).
5. Mezclar 1 parte de la solución de ADN de esperma de arenque desnaturalizado obtenida en el paso 3 con 9 partes de la solución de anticuerpos obtenida en el paso 4 e incubar durante 30 min a 37 °C.
6. Mezclar 1  $\mu\text{g}$  del ADN obtenido de nuestras muestras en 10  $\mu\text{l}$  de PBS, hervir durante 1 minuto y enfriar rápidamente en hielo como en el paso 3.
7. Mezclar 1 parte de la solución de ADN de muestra desnaturalizado obtenida en el paso 6 con 9 partes de la solución de anticuerpos obtenida en el paso 4 e incubar durante 30 min a 37 °C.
8. Preparar un volumen adecuado (10  $\mu\text{l}$  por muestra) de bolitas paramagnéticas y lavarlas 3 veces con una solución de BSA en PBS (1mg BSA/ ml) usando un soporte magnético para eliminar el sobrenadante. Resuspender en BSA en la concentración inicial.
9. Mezclar 10  $\mu\text{l}$  de la suspensión de bolitas paramagnéticas del paso 8 con 20  $\mu\text{l}$  de la solución de ADN del paso 5 o del paso 7 e incubar durante entre 1 y 8 horas a temperatura ambiente y con agitación constante.
10. Poner los tubos del paso 9 en el separador magnético y dejarlas separarse durante 1 minuto.
11. Eliminar el sobrenadante y añadir 100  $\mu\text{l}$  de PBS en BSA (1 mg BSA/ ml) mezclar e incubar durante 1 minuto.
12. Repetir los pasos 10 y 11 7 veces.
13. Eliminar el sobrenadante y resuspender las bolitas paramagnéticas en una solución de bromodeoxyuridina 1.7  $\mu\text{M}$  en Tris-HCl pH 8.3, incubar durante una hora con agitación constante.
14. Poner los tubos de nuevo en el separador magnético y dejar separar las bolitas durante un minuto.
15. Transferir el sobrenadante a un tubo limpio, el ADN marcado está en este tubo y puede utilizarse para distintos métodos basados en PCR a partir de este punto.

## Cuadro sinóptico de la técnica



## Control de calidad

Se realiza en el laboratorio comprobando la extracción de una cantidad suficiente de ADN marcado.

Para el proceso de extracción, incluir un control conteniendo una cantidad similar de ADN bacteriano no marcado. No deberían obtenerse productos de PCR a partir de este control después de realizar la purificación del ADN marcado.

## Referencias

- URBACH, E., K. L. VERGIN, S. J. GIOVANNONI. 1999. «Immunochemical detection and isolation of DNA from metabolically active bacteria». *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 1207-1213.
- HAMASAKI, K, A. TANIGUCHI, Y. TADA, R. A. LONG, F. AZAM. 2007. «Actively growing bacteria in the Inland Sea of Japan, identified by combined bromodeoxyuridine immunocapture and denaturing gradient gel electrophoresis». *Appl. Environ. Microb.* 73: 2787-2798.

# Muestreo para el estudio de la diversidad del plancton microbiano a partir de sondas específicas

<sup>1</sup>Teira, E.; <sup>2</sup>Varela, M.; <sup>3</sup>Massana, R.

<sup>1</sup>*Universidad de Vigo*

<sup>2</sup>*C.O. A Coruña. Instituto Español de Oceanografía*

<sup>3</sup>*Institut de Ciències del Mar (CSIC)*

## Conceptos generales

El plancton procariota es el principal mediador de los flujos biogeoquímicos en el océano. Evidencias recientes sugieren que aproximadamente un 30% de la remineralización oceánica tiene lugar en el océano profundo. Además, de acuerdo con estimas actuales, existe una enorme diversidad microbiana en las aguas meso- y batipelágicas del océano. Algunos trabajos, centrados fundamentalmente en aguas profundas del océano (por debajo de 200 m), han encontrado que masas de agua diferentes albergan comunidades procarióticas diferentes, probablemente relacionado con la concentración y calidad de los nutrientes que transportan (fundamentalmente orgánicos). Asimismo, los protistas más pequeños (picoeucariotas: células de  $\leq 3 \mu\text{m}$ ) también juegan un papel crucial en los sistemas marinos, contribuyendo significativamente a la producción primaria (protistas fototróficos) o bien como depredadores de procariotas (protistas heterotróficos). Estos últimos juegan un papel central en las redes tróficas microbianas y en la remineralización de nutrientes, tanto en la capa fótica como en las aguas profundas.

El estudio de la diversidad del plancton microbiano puede abordarse mediante el uso de técnicas moleculares basadas en el análisis de la huella genética del ADN (por ejemplo el análisis del polimorfismo de la longitud del fragmento de restricción terminal, T-RFLP; o el análisis automatizado del espaciador intergénico ribosomal, ARISA) que proporcionan información fundamentalmente cualitativa, es decir, sobre la riqueza de la muestra (número de unidades taxonómicas operativas, OTU, diferentes). Sin em-

bargo, es importante determinar la abundancia relativa de cada OTU, ya que dos muestras pueden presentar la misma riqueza, pero diferente diversidad. Una técnica que permite simultáneamente identificar y determinar la abundancia de grupos taxonómicos de procariotas es la *Hibridación In Situ Fluorescente* (FISH).

### Finalidad. Campo de aplicación

Metodología para obtener muestras de plancton procariota y piceoeucariota ( $\leq 3 \mu\text{m}$ ) a distintas profundidades de cada estación de muestreo para cuantificar la abundancia de los diferentes grupos planctónicos.

### Equipamiento necesario

Las muestras se toman directamente de las botellas oceanográficas convencionales. Tras la fijación de las muestras, es necesario un equipo de filtración múltiple (para filtros de 25 mm) equipado con embudos de extensión para 100 ml de muestra y una bomba de vacío, con el fin de conseguir un procesamiento rápido de las muestras.



Bomba de vacío.



Equipo de filtración múltiple.



Equipo de filtración con embudos de extensión.

### Descripción de la técnica

*Recogida y fijación de muestras de plancton procariota:* Las muestras se tomarán directamente de las botellas oceanográficas en tubos estériles desechables de 50 ml o frascos de plástico de 100 ml (que se lavarán entre muestreo y muestreo). Dependiendo de la profundidad se tomarán entre 10 y 80 ml (2 réplicas) de muestra. En general, se recogerán 10-30 ml en aguas superficiales ( $<200 \text{ m}$ ), 40 ml en aguas mesopelágicas (200-1000 m) y 80 ml en aguas batipelágicas ( $>1000 \text{ m}$ ). Se recomienda un chequeo rá-



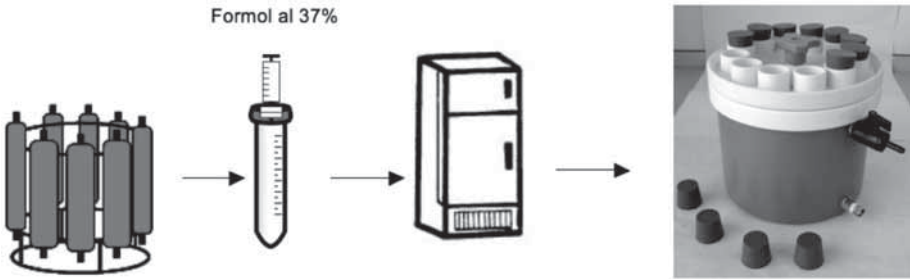
pido mediante tinción DAPI (4,6 Diamino 2-Fenil-Indol) y microscopía (ver apartado correspondiente) para asegurarse de que la densidad celular es adecuada. De forma aproximada, para una densidad del orden de  $10^6$  células  $\text{ml}^{-1}$  son adecuados 10 ml de muestra. A continuación, fijar las muestras añadiendo formaldehído al 37% libre de partículas (utilizando una jeringuilla y un filtro de  $0.2 \mu\text{m}$  desechable) hasta una concentración final del 2%. Mantener la muestra en oscuridad a  $4^\circ\text{C}$  (en nevera) entre 1-24 h antes de proceder al filtrado.

*Recogida y fijación de muestras de picoplancton eucariota:* las muestras se tomarán directamente de las botellas oceanográficas en frascos de plástico de 100 - 500 ml (que se podrán lavar entre muestreo y muestreo). Para las muestras superficiales (hasta 200 m) se tomarán 95 ml de muestra (2 réplicas), a los que se añadirán 5 ml de formaldehído al 37% libre de partículas (antes del muestreo se puede filtrar 1 litro por filtros de  $0.2 \mu\text{m}$  de acetato de celulosa de 47 mm). Para las muestras profundas (más de 200 m) se tomarán 475 ml de muestra (2 réplicas), a los que se añadirán 25 ml de formaldehído al 37% libre de partículas. Mantener la muestra en oscuridad a  $4^\circ\text{C}$  (en nevera) entre 1-24 h antes de proceder al filtrado.

*Filtrado de las muestras de plancton procariota:* poner unas gotas de agua ultrapura (tipo Milli-Q) en las posiciones del sistema de filtración, si estuviera seco. Colocar filtros de nitrocelulosa de  $0.8 \mu\text{m}$  en las posiciones del sistema de filtración. A continuación, se colocan encima los filtros de policarbonato de  $0.2 \mu\text{m}$  con la cara brillante hacia arriba. Una vez filtradas las muestras, lavar los filtros dos veces con 10 ml de agua ultrapura. Dejar secar los filtros colocándolos con cuidado sobre papel absorbente (manteniendo siempre la cara brillante hacia arriba). Una vez secos, se introduce el filtro con cuidado en tubos debidamente etiquetados de 1.5-2 ml (asegurándose que la cara brillante, aquella que contiene las células, está hacia dentro) y se almacenan los tubos en las cajas de congelación debidamente etiquetadas a  $-20^\circ\text{C}$ .

*Filtrado de las muestras de picoplancton eucariota:* poner unas gotas de agua ultrapura en las posiciones del sistema de filtración si estuviera seco. A continuación, colocar filtros de acetato de celulosa de  $0,8 \mu\text{m}$  en las posiciones del sistema de filtración. Colocar encima los filtros de policarbonato de  $0.6 \mu\text{m}$  con la cara brillante hacia arriba. Una vez filtradas las muestras, lavar los filtros dos veces con 10 ml de agua ultrapura. Dejar secar los filtros colocándolos con cuidado sobre papel absorbente (manteniendo siempre la cara brillante hacia arriba). Una vez secos, se introduce el filtro con cuidado en tubos debidamente etiquetados de 1.5-2 ml (asegurándose que la cara brillante, aquella que contiene las células, está hacia dentro) y se almacenan los tubos en las cajas de congelación debidamente etiquetadas a  $-20^\circ\text{C}$ .

Cuadro sinóptico de la técnica



Reactivos u otro material fungible

Conservantes: Formaldehído al 37%.

Mezcla de DAPI (2 ml):

Reactivo	Cantidad	[ ] final
DAPI 50 µg mL <sup>-1</sup>	40 µL	1 µg mL <sup>-1</sup>
PBS	140 µL	
Vectashield	280 µL	
Citifluor	1540 µL	

- Tubos de 50 ml estériles.
- Frascos de 100 y 500 ml.
- Jeringuillas desechables de 20 y 50 ml.
- Filtros estériles desechables de 0.2 µm (para prefiltrado del formol).
- Filtros de acetato de celulosa de 0.8 µm y 25 mm de diámetro.
- Filtros de policarbonato blancos de 0.2 y de 0.6 µm y de 25 mm de diámetro.
- Viales para centrifuga de 1.5-2 ml.
- Cajas de congelación de cartón para viales de 1.5-2 ml.

Control de calidad

Se tratará de hacer chequeos mediante microscopía. Para ello se filtra un volumen determinado de muestra de la misma forma que se explica en el apartado “Descripción de la técnica”. Una vez seco el filtro, colocarlo en un portaobjetos, añadir una gota de la mezcla de DAPI, colocar un cubreobjetos y observar la muestra en un microscopio de epifluorescencia equipado con filtros adecuados para la observación del DAPI. La densidad óptima de células recogidas sobre los filtros para el procesado posterior de los filtros en el caso del plancton procariota es de entre 100-300 células en un área de 10<sup>4</sup> µm<sup>2</sup>.

# Obtención de muestras para la determinación de la composición de la comunidad vírica

Vaqué, D.; Lara, E.; Sà, E-L.; González-Acinas, S.

*Institut de Ciències del Mar (CSIC)*

## Finalidad. Campo de aplicación

Estimar los cambios de en la composición de las comunidades de virus mediante la técnica de fingerprinting RAPD-PCR con la que conseguiremos descifrar fragmentos de secuencias víricas, gracias a una amplificación en la que se usan cebadores de secuencia corta y aleatoria que se unirán a diversos puntos del genoma vírico (Winget y Wommack, 2008).

## Conceptos generales

Los virus son los entes biológicos más abundantes en los sistemas acuáticos, y una gran mayoría tienen a las bacterias como hospedadores (Furhman, 1999). En la actualidad se están realizando grandes avances en estudios sobre la diversidad de los virus utilizando técnicas de metagenómica (Paul y Sullivan, 2005). En la Campaña Malaspina hemos recogido muestra de profundidades discretas a 4000 m para metagenómica de virus y además de forma sistemática en todas las estaciones entre 3 y 5 profundidades para determinar la composición de la comunidad de virus mediante la técnica de huella genética RAPD-PCR (Weinbauer et ál. 2009).

## Equipamiento necesario

- Bomba peristáltica Watson-Marlow.
- Portafiltros para filtros de 47 mm de diámetro.

## Reactivos u otro material fungible

- Agua ultrapura.
- Cebadores y patrones.
- Filtros de 50  $\mu\text{m}$ , 0.8  $\mu\text{m}$  y 0.2  $\mu\text{m}$ .
- Membrana (o cartucho VIVAFLOW) de 30KDa: retendrá los virus dejando pasar el agua libre de virus.
- Tubos de silicona.
- Jarras de plástico, probetas.
- Pipetas regulables.
- Puntas de pipeta.
- Nevera portátil.
- Hielo.
- NaOH, 0.5 N.
- Lejía.
- Etanol 5%.

## Calibración

Se realizará mediante la utilización de distintos cebadores sobre distintas muestras. Los resultados en los geles de agarosa se compararán con los de los patrones.

## Descripción de la técnica

Para poder llevar a cabo estas técnicas en el laboratorio, durante la campaña debemos concentrar en unos pocos mililitros los virus presentes en varios litros (5-10 l) de agua. Lo haremos mediante un protocolo de filtración tangencial utilizando membranas de polietersulfona de 30KDa donde las partículas víricas serán retenidas y posteriormente recuperadas (Winget et ál., 2005).

### – Recogida de muestras:

Las muestras provienen de un perfil de 3-5 profundidades. Para muestras profundas (4000 -1000 m) se filtrarán entre 10 y 20 litros, mientras que para muestras superficiales serán suficientes 2-5 litros de agua prefiltrada por 0.2  $\mu\text{m}$ . A partir de aquí los virus se concentrarán mediante filtración tangencial en cartuchos (VIVAFLOW) de 30 KDa.

### – Esquema general del sistema de filtración tangencial:

- Bomba peristáltica Watson-Marlow.

- Membrana (o cartucho, VIVAFLOW) de 30Kda: retendrá los virus dejando pasar el agua libre de virus.
- Tubos de silicona: la membrana está conectada a 3 tubos (Figura 1):
  - Tubo #1: es el tubo de entrada. Pasa por el cabezal de la bomba y aspira la muestra en dirección a la membrana.
  - Tubo #2: es el de recirculación. Lleva adherido un pequeño manómetro. Su función es recircular el agua que acaba de pasar por la membrana, de modo que vamos obteniendo una muestra cada vez más concentrada de partículas víricas.
  - Tubo #3: es el tubo de salida. Más delgado que los otros dos. Saca del sistema el agua libre de virus (= ultrafiltrado) procedente de la membrana (ya que estos no han podido atravesarla).
- **Protocolo de concentración de virus mediante filtración tangencial:**
  - Recoger en un contenedor limpio los litros de agua de mar prefiltrados por 0.2  $\mu\text{m}$  cuyos virus se desea concentrar.
  - Montar el sistema en el MODO LIMPIEZA (Figura 4).
  - Pasar 500 ml de agua ultrapura para eliminar el etanol del interior de la membrana.
  - Limpiar el recipiente de plástico de 5 l donde irá la muestra, primero con agua ultrapura y después con la misma muestra.
  - Poner la muestra en el recipiente de 5 l limpio. (Si vamos a filtrar más de 4 l, iremos añadiendo muestra a medida que se vacíe el recipiente).
  - Poner el sistema en MODO FILTRACIÓN (Figura 1).
  - Filtrar la muestra (= agua de mar prefiltrada por 0.2  $\mu\text{m}$ ). Durante el proceso de filtrado, deben guardarse aparte 500 ml de ultrafiltrado, que se usarán más tarde.
  - Fase final de la filtración: cuando queden tan solo 100 ml de muestra en el recipiente original, parar la bomba y trasvasarlos a un tubo de plástico de 30 ml (falcon) estéril, junto con los tubos 1 y 2.
  - Utilizaremos 200 ml del ultrafiltrado recogido previamente para lavar 3 veces el vaso que contenía la muestra, con el fin de arrastrar los virus adheridos a las paredes del vaso.
  - A medida que se absorbe la muestra del falcon, le vamos añadiendo el ultrafiltrado.
  - Parar la bomba cuando queden <5 ml de muestra en el falcon, y en todo caso, ANTES de que el tubo aspire aire.
  - Poner el sistema en MODO REVERSO (Figura 3). Es importante cerrar el paso del tubo 3.
  - En el mismo falcon recogeremos 20 ml del concentrado de virus que expulsa el tubo #1. Rotular bien, asegurar el tapón con parafilm y guardar a 4 °C.

#### - Protocolo de limpieza de la membrana

- Poner el sistema en MODO LIMPIEZA (Figura 4).
- Pasar 200 ml de agua ultrapura.
- Preparar la solución de limpieza: 250 ml de NaOH 0.5M + 2 ml de lejía.
- Pasar 50 de los 250 ml de solución limpieza.
- Poner el sistema en MODO RECIRCULACIÓN (Figura 2).
- Recircular los 200 ml que quedan de solución limpieza durante 30-40 minutos.
- Poner el sistema en MODO LIMPIEZA (Figura 4).
- Pasar 100 ml de agua ultrapura.
- Poner el sistema en MODO RECIRCULACIÓN (Figura 2).
- Recircular 500 ml de agua ultrapura durante 5-10 minutos.
- Poner el sistema en MODO LIMPIEZA (Figura 4).
- Pasar los 500 ml de agua ultrapura.
- Preparar un falcon con 50 ml de etanol al 10% y pasarlos por la membrana.
- Parar la bomba ANTES de que entre aire en la membrana.
- Desconectar los 3 tubos y cerrar las salidas de la membrana, de modo que ésta quede llena de etanol y sin burbujas de aire.
- Limpiar externamente los tubos con papel impregnado en etanol. Tapar los extremos de los tubos con papel de aluminio para evitar que entre suciedad.
- Apuntar en la membrana los litros de muestra pasados.
- Conservar los tubos y la membrana a 4 °C.

## Cuadro sinóptico de la técnica

## MODO FILTRACIÓN

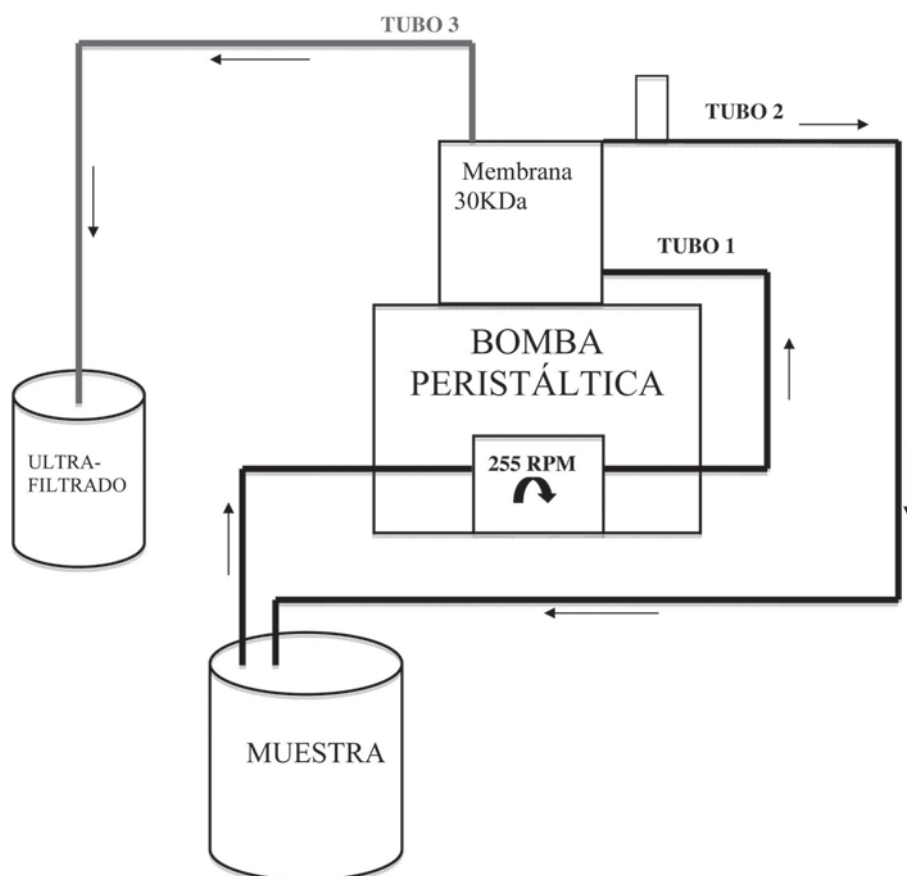


Figura 1.

BOMBA: 255 RPM EN EL SENTIDO DE LAS AGUJAS DEL RELOJ.

**TUBO 1:** absorbe la muestra hacia la membrana, pasando a través del cabezal de la bomba.

**TUBO 2:** devuelve la muestra con virus al vaso, de modo que ésta se va concentrando.

**TUBO 3:** expulsa fuera del sistema la fracción libre de virus o ultrafiltrado.

### MODO RECIRCULACIÓN

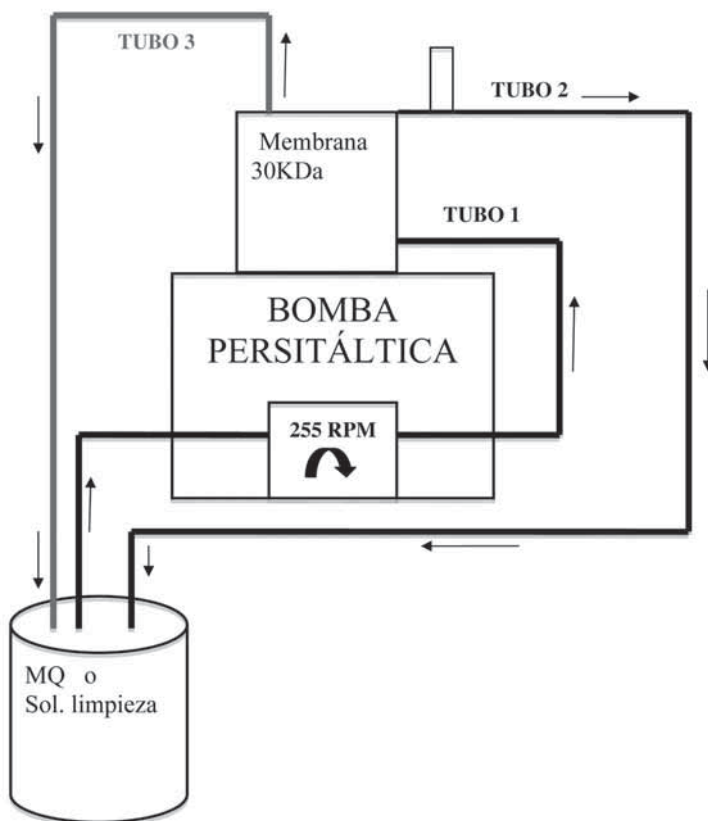


Figura 2.

**BOMBA:** 255 RPM EN EL SENTIDO DE LAS AGUJAS DEL RELOJ.

**TUBO 1:** pasa por el cabezal de la bomba y absorbe agua MQ o sol. limpieza hacia la membrana.

**TUBO 2:** vuelve al vaso de limpieza, permitiendo la recirculación.

**TUBO 3:** vuelve al vaso de limpieza, permitiendo la recirculación.



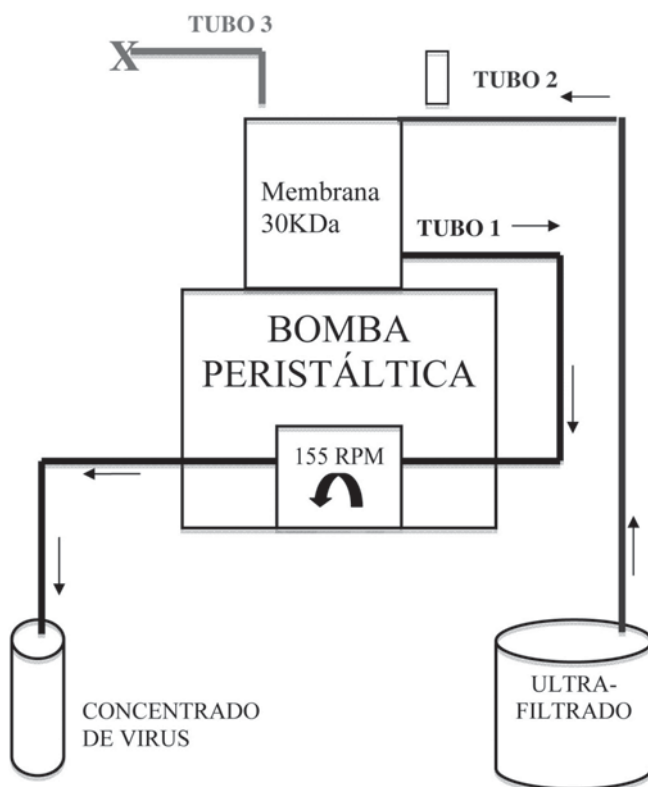
**MODO REVERSO**

Figura 3.

**BOMBA:** 155 RPM EN SENTIDO CONTRARIO A LAS AGUJAS DEL RELOJ.  
**TUBO 1:** pasa a través del cabezal de la bomba expulsando la muestra concentrada.  
**TUBO 2:** absorbe ultrafiltrado para empujar el concentrado hacia el falcon.  
**TUBO 3 :** debe permanecer cerrado.

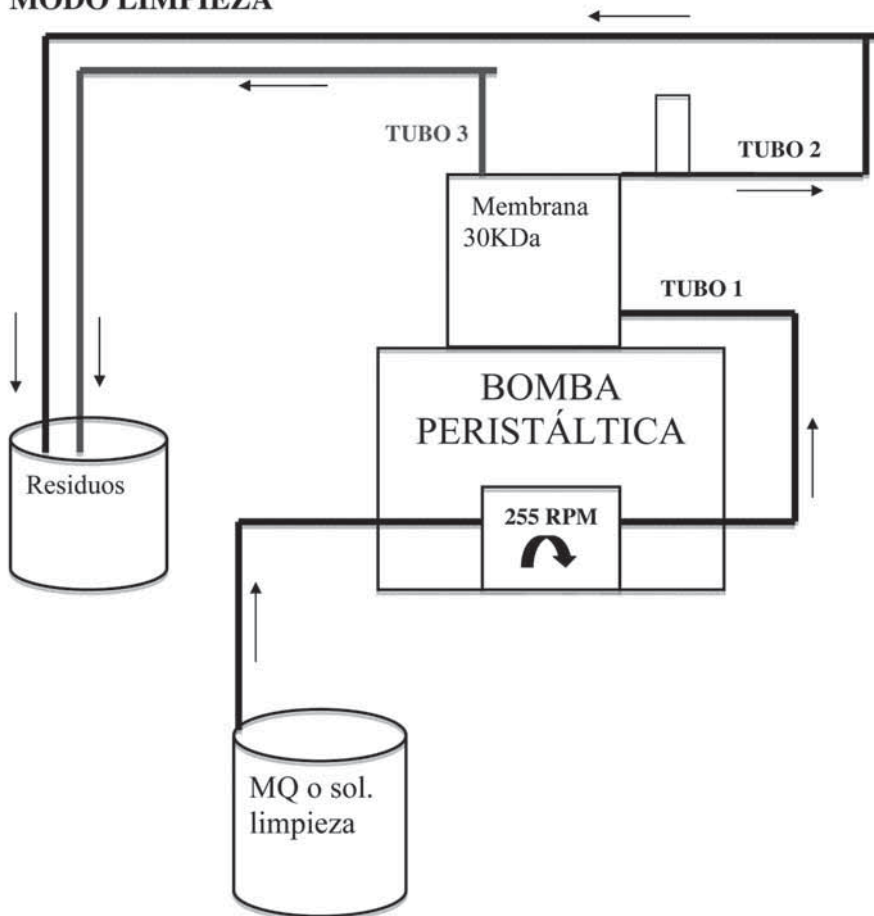
**MODO LIMPIEZA**

Figura 4.

**BOMBA:** 255 RPM EN SENTIDO DE LAS AGUJAS DEL RELOJ.

**TUBO 1:** pasa a través del cabezal de la bomba en dirección a la membrana.

**TUBO 2:** lleva el émbolo. Sale de la membrana en dirección al recipiente de residuos.

**TUBO 3 :** es el más fino. Sale de la membrana y se dirige al recipiente de residuos.

## Obtención de resultados

Una vez tenemos los concentrados, en el laboratorio se va a proceder a:

- ultraconcentrar los virus mediante ultracentrifugación a 100000g durante 2 h.
- A partir de aquí se prepararán los insertos que se pueden almacenar a 4 °C el tiempo que sea necesario hasta que se corra la electroforesis.
- Los insertos se tratarán con distintos cebadores y se escogen los que den una mejor separación de bandas en el gel de agarosa.

Para ello seguiremos la técnica descrita en Weinbauer et ál. (2009).

## Referencias

- FUHRMAN, J. A. 1999. «Marine viruses and their biogeochemical and ecological effects». *Nature* 399: 541-548, doi:10.1038/ 21119.
- PAUL, J. H., M. B. SULLIVAN. 2005. «Marine phage genomics: what have we learned?» *Environ. Biotechnol.* 16: 299-307.
- WEINBAUER, M. G., J. M. ARRIETA, C. GRIEBLER, G. J. HERNDL. 2009. «Enhanced viral production and infection of bacterioplankton during an iron-induced Phytoplankton Bloom in the Southern Ocean». *Limnol. Oceanogr.* 54: 774-784.
- WINGET D. M., K. E. WILLIAMSON, R. R. HELTON, K. E. WOMMACK. 2005. «Tangential flow diafiltration: an improved technique for estimation of virioplankton production». *Aquat. Microb. Ecol.* 41: 221-232.
- WINGET D. M., K. E. WOMMACK. 2008. «Randomly amplified polymorphic DNA (RAPD)-PCR as a tool for assessment of marine viral richness». *Appl. Environ. Microbiol.* 74: 2612-1618.



# Determinación de la diversidad funcional del bacterioplancton marino

Sala, M. M.; Mestre, M.; Borrull, E.

*Institut de Ciències del Mar (CSIC)*

## Finalidad. Campo de aplicación

Estimar la diversidad funcional del bacterioplancton marino mediante el test de utilización de más de 100 fuentes de carbono diferente en placas Biolog.

## Conceptos generales

Las bacterias heterotróficas juegan un papel fundamental en los procesos biogeoquímicos de los ecosistemas acuáticos, ya que son los consumidores principales de la materia orgánica disuelta (DOM). La disponibilidad de esta DOM y su composición influyen enormemente en la actividad del bacterioplancton y en su diversidad filogenética (Eiler et ál. 2003), y pueden influir también en la diversidad funcional de la comunidad microbiana.

El ensayo de la utilización de las diversas fuentes de carbono que componen la materia orgánica se ha hecho generalmente mediante cultivos de enriquecimiento en los que se ofrece un nutriente y se monitoriza los cambios en la producción y/o en la concentración bacteriana durante la incubación. Sin embargo, estos experimentos son laboriosos y permiten el ensayo de un número limitado de sustratos. Las placas Biolog representan una miniaturización de estos enriquecimientos y, de manera muy simple, permiten el ensayo de la utilización de casi un centenar de sustratos simultáneamente. Aunque las placas Biolog fueron inicialmente creadas para la identificación de microorganismos de interés médico, Garland y Mills (1991) propusieron el uso de las placas Biolog para determinar la diversi-

dad funcional de microorganismos en muestras ambientales, basándose en los perfiles de utilización de fuentes de carbono. Desde su aplicación en muestras naturales, las placas Biolog han sido una herramienta muy útil para detectar diferencias en la utilización de fuentes de carbono por las comunidades microbianas. Aunque su principal aplicación ha sido en ecosistemas terrestres (ver revisión en Preston-Mafham et ál. 2002), su espectro de aplicación en ecosistemas acuáticos abarca ambientes tan distintos como lagos (Grover y Chrzanowski, 2000), ríos (Sinsabaugh y Foreman, 2001) y distintos ecosistemas marinos (por ejemplo Sala et ál. 2005, 2006, 2008).

Las placas más utilizadas han sido, junto a las Biolog-Eco, las placas Biolog-GN2 que permiten el ensayo simultáneo de 95 fuentes de carbono, principalmente monómeros.

Cada uno de los pocillos de las placas Biolog, contiene, además del sustrato una sal de tetrazolio que hace de indicador de la oxidación del sustrato. Tras la inoculación de las placas, a medida que las bacterias de la muestra crecen en cada uno de los pocillos, éstas van oxidando los sustratos y se va formando NADH. El producto reducido, formazán insoluble, aparece en forma de color púrpura en los pocillos que puede medirse fotométricamente. El patrón de absorbancias resultante de la lectura de la placa es función de la comunidad original inoculada en los pocillos.

El abanico de fuentes de carbono ensayadas puede ser ampliado mediante el uso de placas MT. Cada uno de los pocillos de las placas MT contiene el indicador de oxidación, el tetrazolio, pero no incluye ningún tipo de sustrato. De esta manera, las placas MT permiten elegir los sustratos en función de los intereses particulares de cada estudio. Las placas MT han servido recientemente para estudiar la utilización de 20 sustratos distintos durante el invierno en el Océano Ártico (Fernández-Gómez unpublished data). En la actualidad, hemos adaptado las placas MT con el propósito de estudiar la utilización de fuentes de carbono en distintos océanos y profundidades. Para ello, han sido seleccionadas 8 fuentes de carbono, no incluidas en las placas GN2, de potencial relevancia en los ecosistemas marinos y/o profundos: bicarbonato, dimetilsulfoniopropionato (DMSP), D-ácido aspártico, un pentapéptido de alanina, almidón, celulosa, quitina y adenosín trifosfato (ATP).

## **Equipamiento necesario**

El equipamiento necesario es un lector de placas de absorbancia y un ordenador.

## **Reactivos u otro material fungible**

1. Placas Biolog GN2 y MT.
2. Pipeta multicanal.

3. Receptáculos para el pipeteado.
4. Substratos para las placas MT.
5. Puntas de pipeta.

## Calibración

Uno de los pocillos en las placas Biolog no contiene sustrato, y sirve como blanco con el que comparar los valores de absorbancia de los pocillos con sustratos.

## Descripción de la técnica

El primer paso consiste en la adición de sustratos a los pocillos de las placas MT. Se añaden 30  $\mu\text{L}$  de 8 diferentes sustratos (a la concentración final 10 de mM): bicarbonato sódico (Sigma); dimetilsulfonolpropionato, DMSP (Research plus, Inc) , D-ácido aspártico (Aldrich); un pentapéptido de alanina: D-alanil-D-alanil-D-alanil-D-alanil-D-alanil (Aldrich); almidón de patata (Fluka); celulosa (Sigma); quitina de caparazones de gambas (Sigma), Adenosina 5'-trifosfato disodio sal hydrato, ATP, (Sigma).

Las placas son inoculadas mediante la adición de un volumen de muestra en cada pocillo: 120  $\mu\text{L}$  en las MT, y 150  $\mu\text{L}$  en las GN2. Una vez inoculadas, las placas se incuban en la oscuridad a temperatura cercana a la in situ y se mide la absorbancia regularmente a 590 nm con el lector de placas. Tras sustraer los valores de absorbancia del blanco, los datos serán utilizados tanto para análisis multidimensionales para el estudio de la diversidad funcional de la comunidad, como para el estudio detallado de utilización de cada uno de los sustratos.

## Resumen de la técnica

1. Adición de los sustratos en las placas MT.
2. Inoculación de las placas GN2 y MT con la muestra.
3. Incubación de las placas en la oscuridad y a temperatura cercana a la in situ.
4. Lectura a distintos tiempos de la absorbancia de las placas en el lector. Dependiendo de la muestra, entre cada dos y cinco días, y hasta un mes.

## Cálculo de los resultados

Inicialmente, se realiza una gráfica de absorbancia total de la placa en el tiempo (suma de la absorbancia de cada uno de los pocillos), y a partir de ella, se elige la fecha en la que se llega a un nivel máximo de absorbancia.

Los resultados se calculan sumando la absorbancia de cada uno de los pocillos, después de haber restado el blanco, y calculando el porcentaje de absorbancia de cada uno de los pocillos respecto al total. Los porcentajes se usarán para el tratamiento de los datos mediante técnicas estadísticas de análisis multidimensional.

## Referencias

- EILER, A., S. LANGENHEDER, S. BERTILSSON, L. J. TRANVIK. 2003. «Heterotrophic bacterial growth efficiency and community structure at different natural organic carbon concentrations». *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 3701-3709.
- GARLAND, J. L., A. L. MILLS. 1991. «Classification and characterization of heterotrophic microbial communities on the basis of patterns of community-level sole-carbon-source utilization». *Appl. Environ. Microbiol.* 57: 2351-2359.
- GROVER, J. P., T. H. CHRZANOWSKI. 2000. «Seasonal patterns of substrate utilization by bacterioplankton: case studies in four temperate lakes of different latitudes». *Aquat. Microb. Ecol.* 23: 41-54.
- HOLLIBAUGH, J. T. 1994. «Relationship between thymidine metabolism, bacterioplankton community metabolic capabilities, and sources of organic matter». *Microb. Ecol.* 28: 117-131.
- PRESTON-MAFHAM, J., L. BODDY, P. F. RANDERSON. 2002. «Analysis of microbial community functional diversity using sole-carbon-source utilisation profiles - a critique». *FEMS Microbiol. Ecol.* 42: 1-14.
- SALA, M. M., L. ARIN, V. BALAGUÉ, J. FELIPE, Ò. GUADAYOL, D. VAQUÉ. 2005. «Functional diversity of bacterioplankton assemblages in western Antarctic seawaters during late spring». *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 292: 13-21.
- SALA, M. M., M. ESTRADA, J. M. GASOL. 2006. «Seasonal changes in the functional diversity of bacterioplankton in contrasting coastal environments of the NW Mediterranean». *Aquat. Microb. Ecol.* 44: 1-9.
- SALA, M. M., R. TERRADO, C. LOVEJOY, F. UNREIN, C. PEDROS-ALIO. 2008. «Metabolic diversity of heterotrophic bacterioplankton over winter and spring in the coastal Arctic Ocean». *Environ. Microbiol.* 10: 942-949.



# Determinación de la actividad bacteriana mediante la incorporación de leucina radiactiva

<sup>1</sup>Gasol, J.M.; <sup>2</sup>Morán, X. A. G.

<sup>1</sup> *Institut de Ciències del Mar (CSIC)*

<sup>2</sup> *C.O. Xixón. Instituto Español de Oceanografía*

## Finalidad. Campo de aplicación

Se trata de determinar la actividad heterotrófica global de bacterias y arqueas por medio de la incorporación de leucina radiactiva. El protocolo tiene dos partes:

- recogida de muestras, incubación y mantenimiento.
- análisis.

El análisis puede efectuarse en el barco o en el laboratorio.

## Conceptos generales

El protocolo que seguimos está muy bien desarrollado en las publicaciones de Kirchman (1993), Gasol (1999) y Reinthaler et ál. (2006).

De los métodos publicados para la estimación de la producción heterotrófica por parte de los procariotas, el de la incorporación de leucina (Kirchman et ál. 1985) es el más robusto, a pesar de los posibles problemas en los factores de conversión o en la respiración del trazador (véase la discusión en Del Giorgio et ál. 2011). El método de la timidina es unas 10 veces menos sensible y por tanto imposible para el océano profundo, mientras que el método de la BrDU (Urban et ál. 1999, Nelson y Carlson 2005) es muy laborioso.

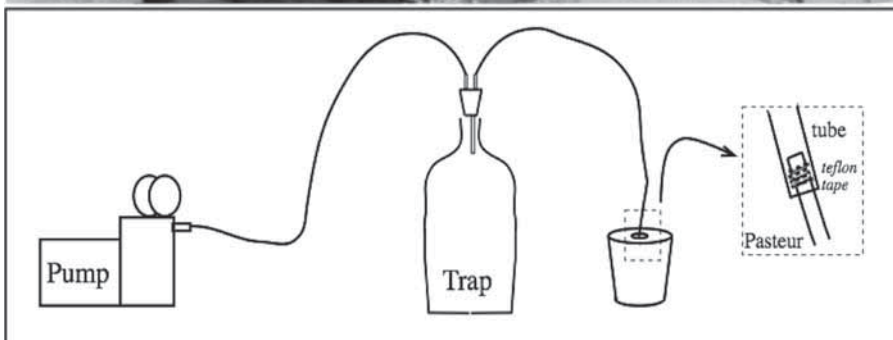
En la campaña Malaspina usamos dos aproximaciones distintas, la de centrifugación de Smith y Azam (1992) para las muestras de superficie, y la de filtración (Kirchman et ál. 1985) para las de profundidad, puesto que con esta aproximación podemos multiplicar por 50 la sensibilidad de la metodología. Además, en profundidad añadimos la incubación con el anti-

biótico bacteriano estreptomycin (Yokokawa et ál. 2011) para diferenciar la incorporación debida a las bacterias de aquella debida a las arqueas (no inhibida con el antibiótico).

### Equipamiento necesario

- Centrífuga refrigerada para tubos eppendorf.
- Vórtex.
- Pipetas para dispensado de muestras.
- Dispensadores de cóctel de centelleo líquido y ácido tricloroacético (TCA).
- Sistema de aspiración de líquidos.
- Contador de centelleo.

Las imágenes siguientes ilustran el montaje para la aspiración de las muestras:



## Reactivos u otro material fungible

- Tubos eppendorf de 1.2 ml.
- Tubos Falcon estériles de 50 ml.
- Solución de TCA al 50% (Sigma-Aldrich).
- Solución de leucina tritiada, a 120-150 mCi mmol<sup>-1</sup>, diluida a una concentración de 1 µM de Leucina con agua ultrapura estéril. Esta solución puede diluirse al 10% con leucina no radioactiva para ahorrar. En Malaspina manteníamos una solución sin diluir (muestras de profundidad), y otra diluida (muestras superficiales).
- Puntas de pipeta estériles.
- Cajas para material potencialmente radiactivo.
- Bandejas para los eppendorfs.
- Solución de TCA al 5%.
- Formaldehído al 37%.
- Solución de estreptomycin a 50 mg ml<sup>-1</sup> (Sigma-Aldrich).
- Filtros de 0.2 µm de policarbonato de 47 mm (Millipore).
- Filtros de membrana de 0.45 µm tipo HAWP de 47 mm (Millipore).
- Cóctel de centelleo Optisafe FilterCount (Perkin-Elmer).
- Cóctel de centelleo Optisafe HiSafe (Wallac Perkin-Elmer).
- Bandejas, bolsas de plástico, etc. necesario para trabajar con radiactividad y guardar los residuos sólidos.

## Descripción de la técnica

### *MUESTRAS SUPERFICIALES (EPI y MESOPELÁGICAS)*

#### Recogida de la muestra e incubación

- Se toman 6 réplicas de 1.2 ml de la muestra y se depositan en 6 eppendorfs marcados con un número de serie y letras de la a a la f. Se fijan las réplicas e y f con 120 µl de la solución de TCA al 50%.
- Se ponen en cada eppendorf 24 µl de Leucina 1 µM (conc. Final, 20 nM). La solución puede ser “caliente” (sin diluir en leucina fría –no radiactiva–) o “tibía”, (diluida por ejemplo 10% en leucina fría).
- Se cierran las muestras y se pasan por el vórtex.
- Se incuban entre 1 y 10 horas a la temperatura in situ. Anotar tiempo de comienzo de la incubación y temperatura escogida.
- Terminada la incubación, se añaden 120 µl de TCA 50% en las muestras a a d.
- En este punto las muestras se pueden congelar para procesar más adelante.

### **Análisis en el barco**

- Se dejan descongelar las muestras.
- Se centrifugan las muestras 10 minutos a 10.000 rpm. Se aspira el sobrenadante, se añade 1 ml de TCA 5% y se pasan de nuevo por el vórtex.
- Se centrifugan otra vez, se aspira el sobrenadante y se añade 1 ml de cóctel de centelleo.
- Se pasan de nuevo por el vórtex y se dejan reposar 24 h. Se mide la radiactividad al día siguiente en un contador de centelleo líquido.

### ***MUESTRAS DE PROFUNDIDAD ( $\geq 1000$ metros)***

#### **Recogida de la muestra e incubación**

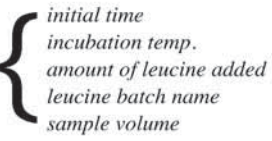
- Se toman 6 réplicas de 40 ml de la muestra (= 240 ml) y se depositan en 6 tubos Falcon estériles de 50 ml, marcados con un número de serie, y las letras de la a a la f. Se fijan las réplicas e y f con 4 ml de formaldehído al 37%.
- Se añaden 80  $\mu$ l de la solución de trabajo de estreptomicina a las réplicas c y d. Las muestras se incuban 30 minutos a oscuras y a 4 °C.
- Se añaden 200  $\mu$ l de leucina tritiada (del stock 1  $\mu$ M lo que resulta en una concentración final de 5 nM). Se usa la leucina caliente sin diluir en leucina fría.
- Se incuba entre 4-12 horas dependiendo de la zona y profundidad.
- La incubación se acaba fijando las muestras con 4 ml de formaldehído al 37%.
- Se mantienen en frío y se procesan en el día o al día siguiente.

### **Análisis en el barco**

- Se filtran las muestras a través de los filtros de 0.2  $\mu$ m colocados encima de un filtro de soporte de 0.45  $\mu$ m previamente humedecido con agua ultrapura.
- Se lava tres veces con 5 ml de TCA 5% (frío).
- Los filtros se colocan en viales de centelleo y cuando están secos se añaden 9 ml de cóctel de centelleo (FilterCount o similar). Al día siguiente (~24 h después) se mide la radiactividad en un contador de centelleo.

## Cuadro sinóptico de la técnica

**Smith & Azam's Leucine method**

- 1 Put 1.2 ml of sample in 6 eppendorfs (labelled a through f)  
 Add 120 µl TCA 50% to controls (e & f)  
 Add 40 nM \*leucine to all of them (48 µl of 1 µM solution)  
 (add leucine concentration depending on saturation curve)  
 Vortex  
 Incubate (1 to 4 h)   
 Write  $\longrightarrow$
- 2 Add 120 µL TCA 50% to samples a through d  
 Vortex  
 Spin 10 min. 12000 g  
 Aspirate water. Make sure no water is left on cap
- 3 Add 1 mL TCA 5%  
 Vortex  
 Spin 10 min. 12000 g  
 Aspirate
- 4 Add 1 mL of cocktail  
 Vortex  
 Place in 22 mL vial and put to count (Program #3)

**Cálculo de los resultados**

- A partir del tiempo de incubación y del volumen utilizado se calculan las “tasas de incorporación”

$$\text{incorporacion} = \frac{4.5 \cdot 10^{-13} \times (dpm_{\text{muestra}} - dpm_{\text{blanco}})}{SA \times T \times V} \text{ en (mmol Leu l}^{-1} \text{ h}^{-1}\text{)}$$

- El factor  $4.5 \cdot 10^{-13}$  corresponde al número de curies por dpm (una constante).
- SA: Actividad específica de la solución en curies por mmol.
- T: Tiempo de incubación en horas.

- V: Volumen de incubación en litros.
- Cálculo de la producción con los valores de la literatura:  

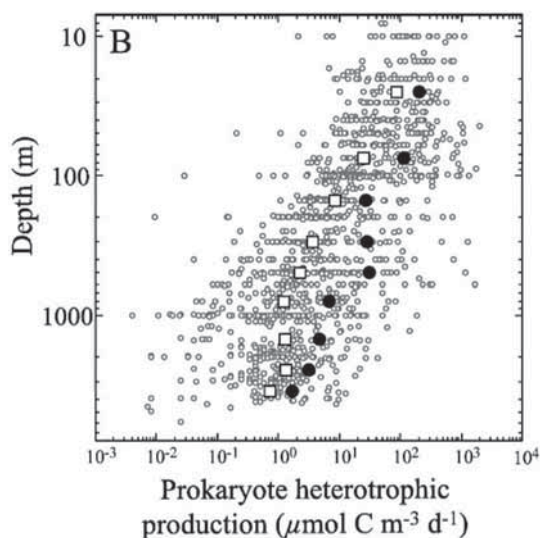
$$\text{mg C l}^{-1} \text{ h}^{-1} = \text{Leu (mmols Leu l}^{-1} \text{ h}^{-1}) \times 131.2 * (\% \text{Leu})^{-1} \times (\text{C:Protein}) \times \text{ID}$$
- 131.2 es el peso molecular de la leucina.
- %Leu es la proporción de leucina en la proteína total. Se asume que es 0.073 (Simon y Azam, 1989).
- C:Prot es la relación de C a proteína. Se asume que es 0,86 (Simon y Azam, 1989).
- ID: Dilución del isótopo. Se asume que es 1 en aguas oligotróficas, y 2 en aguas mesotróficas.

Este valor por el que se multiplica la incorporación de leucina es lo que se llama el factor de conversión (FC) y equivale a 1.5 kgC mol Leu<sup>-1</sup> cuando se asume una dilución del isótopo de 1. En la campaña determinamos algunos FC empíricos siguiendo los protocolos de Kirchman y Ducklow (1993), de Bjørnsen y Kuparinen (1991) y de Del Giorgio et ál. (2011).

## Control de calidad

La gráfica presenta los valores medidos en la literatura en el océano profundo y superficial (Aristegui et ál. 2009):

Dividir la producción por 12 para tenerla en moles de C. Se pueden comparar los valores para saber si tienen sentido. Se pueden poner también en contexto con el trabajo de Ducklow y Carlson (1992).



## Referencias

- ARÍSTEGUI, J., J. M. GASOL, C. M. DUARTE, G. J. HERNDL. 2009. «Microbial oceanography of the dark ocean's pelagic realm». *Limnol. Oceanogr.* 54: 1501-1529.
- BJØRNSSEN, P. K., J. KUPARINEN. 1991. «Determination of bacterioplankton biomass, net production and growth efficiency in the Southern Ocean». *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 71: 185-194.
- DEL GIORGIO, P. A., R. CONDON, T. BOUVIER, K. LONGNECKER, C. BOUVIER, E. SHERR E, J. M. GASOL. 2011. «Coherent patterns in bacterial growth, growth efficiency, and leucine metabolism along a northeastern Pacific inshore–offshore transect». *Limnol. Oceanogr.* 56: 1-16.
- DUCKLOW, H. W., C. A. CARLSON. 1992. «Oceanic bacterial production». *Adv. Microb. Ecol.* 12: 113-181.
- GASOL, J. M. 1999. «How to measure bacterial activity and production with the uptake of radiolabeled leucine». Dirección web: <http://www.icm.csic.es/bio/projects/icmicrobis/pdf/Manual%20Leucina.pdf>
- KIRCHMAN, D. L. 1993. «Leucine incorporation as a measure of biomass production by heterotrophic bacteria». En: KEMP P. F., SHERR B. F., SHERR E. B., COLE J. J. *Handbook of methods in Aquatic Microbial Ecology*. Lewis Pub., pp. 509-512.
- KIRCHMAN, D. L., E. K'NEES, R. HODSON. 1985. «Leucine incorporation and its potential as a measure of protein synthesis by bacteria in natural aquatic systems». *Appl. Environ. Microbiol.* 49: 599-607.
- KIRCHMAN, D. L., H. W. DUCKLOW. 1993. «Estimating conversion factors for the thymidine and leucine methods for measuring bacterial production». En: KEMP P. F., SHERR B. F., SHERR E. B., COLE J. J. *Handbook of methods in Aquatic Microbial Ecology*. Lewis Pub., pp. 513-517.
- NELSON, C. E., C. A. CARLSON. 2005. «A non-radioactive assay of bacterial productivity optimized for oligotrophic pelagic environments». *Limnol. Oceanogr. Methods* 3: 211-230.
- REINTHALER, T., H. VAN AKEN, C. VETH, J. ARÍSTEGUI, C. ROBINSON, P. J. LeB. WILLIAMS, P. LEBARON, G. J. HERNDL. 2006. «Prokaryotic respiration and production in the meso– and bathypelagic realm of the eastern and western North Atlantic basin». *Limnol. Oceanogr.* 51: 1262-1273.
- SIMON, M., F. AZAM. 1989. «Protein content and protein synthesis rates of planktonic marine bacteria». *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 51: 201-213.
- SMITH, D. C., F. AZAM. 1992. «A simple, economical method for measuring bacterial protein synthesis rates in seawater using  $^3\text{H}$ -leucine». *Mar. Microb. Food Webs* 6: 107-114.
- URBACH, E., K. L. VERGIN, S. J. GIOVANNONI. 1999. «Immunochemical detection and isolation of DNA from metabolically active bacteria». *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 1207-1213.

- YOKOKAWA, T., K. OLBRICH, E. SINTES, D. DE CORTE, G. J. HERNDL. 2011. «Heterotrophic activity of Archaea and Bacteria throughout water column of the eastern Atlantic». JÜRGENS K., LABRENZ M. (eds.). *Book of Abstracts, 12th Symposium on Aquatic Microbial Ecology*, pp. 140. Ed. Leibniz Institute for Baltic Sea Research Warnemünde.



## Medida de la respiración mediante cambios *in vitro* de la concentración de O<sub>2</sub>

<sup>1</sup>Aristegui, J.; P. Mazuecos<sup>2</sup>, I.; Vázquez-Domínguez<sup>3,4</sup>, E.

<sup>1</sup>*Instituto de Oceanografía y Cambio Global,  
Universidad de Las Palmas de Gran Canaria*

<sup>2</sup>*Departamento de Ecología Facultad de ciencias, Universidad de Granada*

<sup>3</sup>*Departamento de Biología Marina y Oceanografía,  
Institut de Ciències del Mar (CSIC)*

<sup>4</sup>*C.O. Gijón. Instituto Español de Oceanografía*

### Finalidad. Campo de aplicación

Determinación de la respiración en el océano profundo mediante cambios en la concentración de oxígeno disuelto dentro de botellas, utilizando el método Winkler.

El oxígeno es un elemento directamente relacionado con el metabolismo aeróbico de los organismos vivos. Se produce en reacciones anabólicas tales como la fotosíntesis y se consume en reacciones catabólicas como la respiración. Por tanto, la determinación de su concentración en medio acuático proporciona información muy valiosa sobre los procesos biológicos y balances metabólicos en ecosistemas acuáticos.

Aunque la determinación química de oxígeno disuelto en muestras de agua fue descrita por primera vez en el siglo XIX (Winkler, 1888), las medidas de metabolismo planctónico basadas en cambios en la concentración de oxígeno no fueron introducidas hasta el inicio del siglo XX por Gardner y Gran (1927). El método Winkler está basado en que el oxígeno de las muestras de agua marina oxida el ión yoduro a yodo y la cantidad de yodo generado es determinado mediante titración con una solución de concentración conocida de tiosulfato sódico. La cantidad de oxígeno disuelto se calcula a partir del volumen de tiosulfato añadido durante la titración hasta alcanzar el punto final. Este método ha sido uno de los más usados, no solo por su simplicidad, sino también debido a su precisión; sobre todo gracias al desarrollo de sistemas automatizados con detección del punto final de la valoración, bien potenciométrica o colorimétrica, que han aumentado considerablemente la sensibilidad del método.

## Conceptos generales

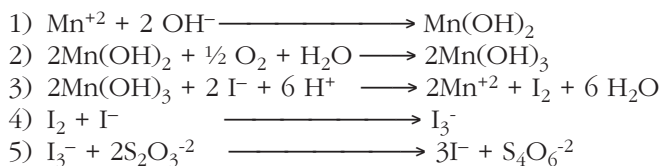
La técnica que se describe en este protocolo está basada en la incubación de muestras de agua de mar en botellas DBO (Demanda Biológica de Oxígeno) de c.a. 100 ml de capacidad. Varias de estas botellas son usadas para establecer la concentración inicial de oxígeno (Botellas iniciales; Bi), mientras que otra serie de botellas se incuban en oscuridad a temperatura in situ ( $\pm 0,1$  °C) durante aproximadamente 24-72 h (Botellas oscuras: Bo). La respiración se obtiene, bien mediante la diferencia en la concentración de oxígeno entre el tiempo inicial y final del experimento, o como la pendiente de la recta de regresión debida a la disminución de oxígeno a lo largo del tiempo (e. g. Arístegui et ál. 2005).

Para evitar problemas de interacción entre la fase acuosa y la atmósfera es muy importante que las botellas estén completamente sumergidas en agua (por encima del tapón) durante la incubación, incluso una vez que se han fijado las muestras y hasta el momento de ser valoradas. Si no, podría haber intercambio de gases entre el aire y el agua de las botellas (por diferencias en la presión parcial de los gases), creándose burbujas de aire que alterarían la concentración de oxígeno o el volumen real de líquido a valorar.

Para la preparación y dosificación de los reactivos que se añaden al agua de mar para fijar la muestra, se siguieron las recomendaciones hechas por Carpenter (1965) y Carrit y Carpenter (1966). La detección del punto final de la valoración Winkler se llevará a cabo espectrofotométricamente, mediante un sistema comercial (DOA SiS) automatizado, controlado por un microprocesador, basado en el sistema descrito por Williams y Jenkinson (1982).

Las reacciones que tienen lugar para la determinación de la concentración de oxígeno disuelto son las siguientes:

Una vez añadidos el reactivo 1 –sulfato de manganeso ( $\text{MnSO}_4$ )– y el reactivo 2 –solución alcalina de yoduro e hidróxido sódico ( $\text{NaOH} + \text{NaI}$ –, las botellas son cerradas cuidadosamente (evitando la aparición de burbujas) y agitadas vigorosamente (para facilitar la reacción). El oxígeno disuelto químicamente reacciona con  $\text{Mn}(\text{OH})_2$  en un fuerte medio alcalino resultando en un precipitado marrón de  $\text{Mn}(\text{OH})_3$ . Después de la fijación y precipitación completa del oxígeno, las botellas permanecen en reposo (bajo el agua) unas horas antes de su análisis. Previamente al análisis, la muestra es acidificada a pH 2.5 – 1.0, provocando que los hidróxidos precipitados sean disueltos, liberando  $\text{Mn}^{+3}$ . Los iones  $\text{Mn}^{+3}$  oxidan el yoduro ( $\text{I}^-$ ) a yodo ( $\text{I}_2$ ). El yodo forma un complejo con el exceso de los iones yoduro, siendo determinado mediante titración con tiosulfato ( $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ ) que es oxidado a tetrationato ( $\text{S}_4\text{O}_6^{2-}$ ).



La fijación de oxígeno es una reacción muy rápida debido a la inestabilidad del  $\text{Mn}^{+2}$  en medio alcalino.

El método está descrito en detalle en Strickland y Parsons (1977).

### Equipamiento necesario

- Analizador de oxígeno disuelto (DOA) de “Sensore Instruments Systems” compuesto por:
  - Bureta Dosimat (Methrom) para dosificar el tiosulfato.
  - Soporte para botella con agitador magnético.
  - Espectrofotómetro con lámparas y fotomultiplicador.
  - Unidad de control e interfaz A/D.
  - Ordenador PC con “*software* DOA SiS” para controlar automáticamente la valoración.
- Botellas de borosilicato DBO.
- Baño termostatzado / refrigerado con cubeta para incubar las muestras.
- Agitadores magnéticos (recubiertos de cristal) y varilla para recogerlos.
- Pipetas automáticas de repetición eppendorf (con cánulas de 12.5 ml) para dispensar los reactivos 1 y 2 (o bien dosificadores de precisión de 1 ml).
- Pipeta automática (y puntas) de 1 ml para dosificar el ácido.
- Bureta Dosimat (Methrom) para dosificar el yodato potásico.
- Botes Pyrex para almacenar reactivos. El reactivo 2 es fotosensible, la botella debe ser ámbar (opaca) o recubierta con papel de aluminio.
- Tubos de silicona para llenar las botellas DBO.
- Ácido clorhídrico y barreño con tapa para lavar las botellas DBO.
- Barreño para mantener las botellas sumergidas en agua antes de valorarlas.
- Termómetro.
- Guantes.
- Bata y gafas de seguridad.
- Botellas para residuos de reactivos (p. e. tiosulfato sódico).

## Reactivos u otro material fungible

### *Reactivos:*

- *Reactivo 1* (para fijar el O<sub>2</sub> de las muestras): Sulfato de manganeso (MnSO<sub>4</sub> · 4 H<sub>2</sub>O).
- *Reactivo 2* (para fijar el O<sub>2</sub> de las muestras): Solución alcalina compuesta por hidróxido sódico (NaOH) y yoduro sódico (NaI).
- Ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), para acidificar la muestra previa a su valoración.
- Tiosulfato sódico (Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> · 5 H<sub>2</sub>O), para la valoración del O<sub>2</sub>.
- Yodato potásico (KIO<sub>3</sub>), para la estandarización del tiosulfato.

### *Preparación de reactivos:*

Los reactivos deben mantenerse en el frigorífico (~ 4 °C) mientras no se usen.

*Reactivo 1:* Disolver 450 g de sulfato de manganeso MnSO<sub>4</sub> · 4H<sub>2</sub>O en 500 ml de agua destilada en una botella de 1 l. Aforar a 1 l con agua destilada y almacenar en una botella de cristal con tapón a rosca (Pyrex).

*Reactivo 2: (NaI+NaOH, solución alcalina de yoduro sódico):* disolver 320 g de NaOH en 400 ml de agua destilada en una botella de 2 l. Esperar a que se enfríe y entonces añadir 600 g de NaI (mezclar muy bien para disolver). Una vez fría, la solución es transferida a un matraz aforado de 1 l y rellenada con agua destilada. Almacenar en botella de cristal con tapón de plástico a rosca (Pyrex).

*Ácido sulfúrico H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 5 M:* 280 ml de ácido sulfúrico en 500 ml de agua destilada en una botella de 1 l. La solución es almacenada fría y entonces llevada a 1 l con agua destilada.

**Nota:** si este reactivo toma un color extraño, debe ser preparado de nuevo.

*Solución de tiosulfato sódico 0.25 M:* disolver 62.04 g Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> · 5H<sub>2</sub>O en un 1 l de agua destilada. La solución es almacenada en una botella ámbar con el tapón a rosca.

*Estándar de yodato potásico, 0.001666 M:* secar ~ 0.5 g KIO<sub>3</sub> a 105 °C durante 1 h. Esperar a que se enfríe y pesar exactamente 0.3567 g de KIO<sub>3</sub>. Disolver en 100 ml de agua destilada y llevar a 1 l con agua destilada.

**Nota:** En el caso de que se use un estándar certificado 0.1 N de KIO<sub>3</sub>, concentración final de una ampolla de 100 ml [titrisol Merck] es llevada hasta 1 l con agua ultrapura (Milli-Q). Esta solución es diluida a 0.01 N con agua ultrapura antes de usarla como estándar.

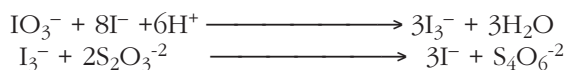
## Calibración

### *Calibración del volumen de las botellas DBO*

Para determinar el volumen exacto de las botellas de borosilicato DBO, se deben pesar vacías y llenas de agua ultrapura (controlando la temperatura del agua) en una balanza de alta precisión ( $300 \pm 0.0001\text{g}$ ). El volumen se determina a partir de la diferencia de ambos pesos, corrigiendo para el coeficiente de expansión de borosilicato, obtenido a partir de la densidad del agua (Kell, 1975). La calibración del volumen de las botellas DBO debe ser realizado de forma muy precisa, ya que la precisión del método depende de ello.

### *Estandarización del tiosulfato*

El tiosulfato puede variar su molaridad por diversos motivos (e. g. cambios bruscos de temperatura), por lo que es conveniente estandarizarlo frecuentemente, y siempre una vez que se preparan reactivos nuevos. Para ello se utiliza una solución estándar de yodato potásico ( $\text{KIO}_3$ ). Bajo condiciones ácidas el yodato reacciona con los iones yoduro hacia yodo, el cual es titrado con tiosulfato.



Para la estandarización se añaden los reactivos en orden inverso: Primero añadir 1 ml de  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , seguido por 1 ml de solución alcalina (reactivo 2) y por último 1 ml de sulfato de manganeso (reactivo 1) sobre 80-100 ml de agua ultrapura o agua marina contenida dentro de una botella BDO. Después se añaden 10 ml de la solución estándar de yodato potásico con una bureta Dosimat (o similar) con una precisión superior a  $1\ \mu\text{l}$ . Es muy importante agitar y mezclar bien la muestra entre dosificaciones. El yodo se valora con la solución de tiosulfato apropiada y la molaridad se calcula como sigue:

$$M_t = (V_i \times M_i \times 6) / V_t$$

Donde  $M_t$ : molaridad del tiosulfato (M),  $V_t$ : volumen de tiosulfato añadido (l),  $V_i$ : volumen de estándar de yodato potásico añadido (ml) y  $M_i$ : molaridad del estándar del yodato (M).

### *Blancos*

Para probar que los reactivos están en buenas condiciones, se deben llevar a cabo controles esporádicos, añadiendo los reactivos de forma inversa; similar al proceso de estandarización, pero sin añadir el yodato potásico. Si el resultado del proceso produce color en los reactivos (debe de estar totalmente transparente) habría que cambiar de reactivos.

## Descripción de la técnica

### *Toma de muestras y preparación de incubaciones*

Las muestras de agua de mar se recogen mediante botellas Niskin y se vierten a una garrafa de plástico (20 l). Para evitar problemas de subsaturación, la garrafa se agita suavemente antes de dispensar el agua con una manguera de silicona, de forma homogénea, en las botellas para DBO. El extremo del tubo de silicona se coloca en el fondo de la botella para eliminar las burbujas de aire que podrían permanecer dentro. Las botellas deben ser llenadas dispensando al menos 2 veces su volumen de agua, y de forma aleatoria. Una vez llenadas, las botellas se colocan en el incubador (baño termostatzado) para comenzar el experimento de respiración. El proceso de llenado debe de realizarse en una zona fresca / fría y en penumbra, evitando la luz directa en las garrafas y las botellas.

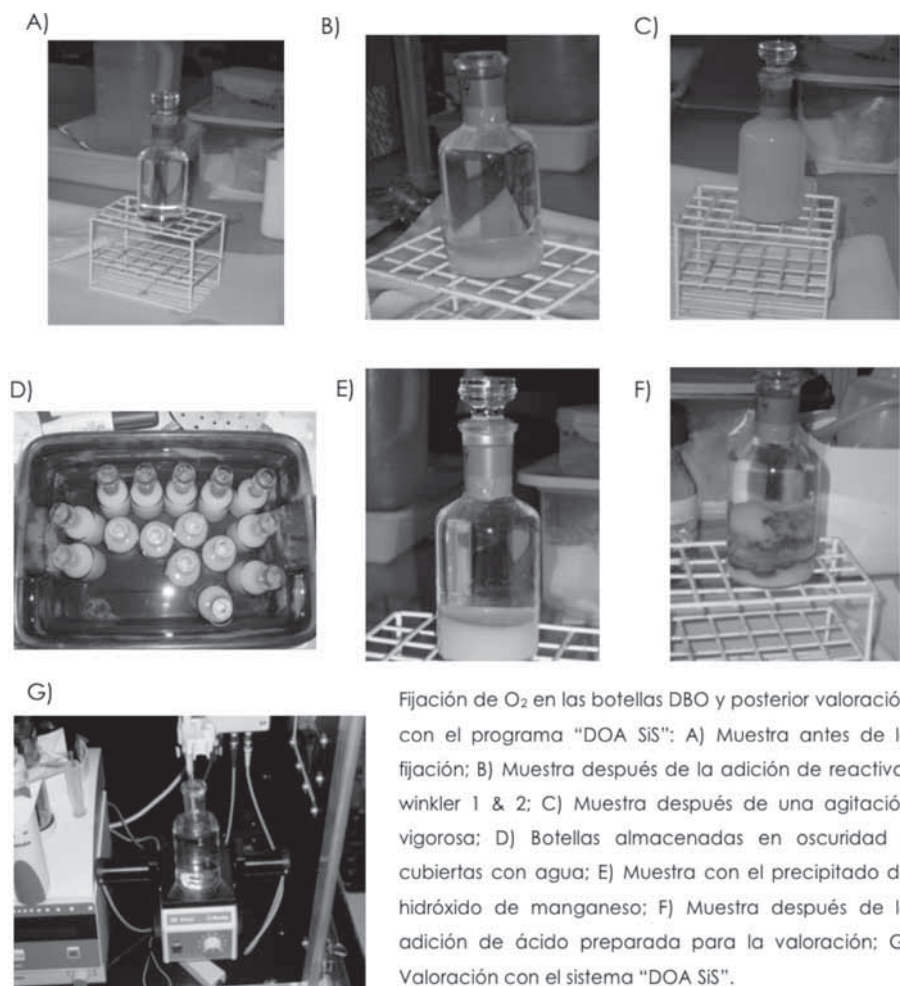
### *Fijación de O<sub>2</sub>*

Las muestras (de 4 a 6 replicados por tiempo) se fijan a intervalos establecidos (e. g. 0h, 12h, 24h, 36h, 48h, 72h) tal y como se ha explicado en el apartado 5, añadiendo los reactivos 1 y 2 sucesivamente. Las botellas deben agitarse vigorosamente al menos dos veces, con un intervalo de unos 5 minutos, para que se forme bien el precipitado, y mantenerlas sumergidas en agua hasta su valoración. Para fijar las botellas iniciales (T0) se debe esperar al menos unas 2 h de incubación para que la temperatura dentro de todas las botellas sea exactamente la misma que la del agua del incubador.

### *Valoración de las muestras*

Cuando el precipitado esté sedimentado (aproximadamente entre 8 y 24 horas; ver Figura E), y nunca después de 48h, se deben valorar las muestras. Retirar el tapón de la botella con cuidado de que no entre agua en el interior y añadir 1 ml de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (inclinando la botella). Insertar la mosca magnética en el fondo de la botella con la varilla, sin provocar burbujas. Colocar la botella sobre el soporte del DOA con el agitador y comenzar la valoración automática con tiosulfato sódico. Al final de la titración, el programa genera una copia de los detalles de la muestra y del proceso de valoración, junto con las estimas de la concentración de oxígeno y porcentajes de saturación.

### Cuadro sinóptico de la técnica



### Cálculo de los resultados

Debe calcularse el valor medio (en  $\mu\text{mol } O_2 \text{ l}^{-1}$ ), coeficiente de variación y error estándar de cada grupo de replicados de botellas. Como estima de referencia, la precisión de los replicados debe ser  $CV < 0.5\%$  para poder detectar cambios significativos en la respiración. En cualquier caso, debería de comprobarse que la diferencia entre valores medios (con sus errores estándar) de grupos de replicados son significativas.

## Control de calidad y errores experimentales

A pesar de la precisión del método, las tasas respiratorias que se miden en el océano oscuro son tan bajas ( $<1 \mu\text{mol O}_2 \text{ l}^{-1} \text{ d}^{-1}$ ) que conviene tener en cuenta algunos aspectos metodológicos importantes que pueden condicionar la estima correcta de estas tasas.

1. Tanto la detección fotométrica como espectrofotométrica del punto final de la valoración son muy precisas, pero a menudo el método potenciométrico implica retirar una alícuota de la botella sobre la que se inserta el electrodo y se hacen las mediciones. En este proceso se puede perder precisión por dos causas: (i) Pérdida por volatilización de  $\text{I}_3^-$  en el proceso de manipular la alícuota, y (ii) control menos preciso en el volumen de la alícuota con respecto a la calibración más exacta del volumen total de la botella
2. El volumen de las botellas debe de ser determinado con una precisión de milésima de gramo, ya que la precisión del método depende en gran medida de lo bien calibradas que estén las botellas
3. Es crítico el control de la temperatura durante todo el proceso de incubación. Generalmente los cambios de oxígeno por procesos físicos (e. g. variación de  $> 0.5 \text{ }^\circ\text{C}$ ) son mucho más acusados que los que se producen por el metabolismo microbiano.
4. Es importante controlar que no se produzca ninguna burbuja ni durante la incubación ni tras haber fijado la muestra con los reactivos 1 y 2 y una vez puesto el tapón. Cualquier botella con burbuja (por pequeña que sea) debe ser desechada.
5. Comprobar frecuentemente la molaridad (M) del tiosulfato. Dosificar con mucha precisión ( $< 1 \mu\text{L}$ ) el yodato, con el fin de obtener una buena replicabilidad en las estimas de M.

## Referencias

- ARÍSTEGUI, J., C. M. DUARTE, J. M. GASOL, L. ALONSO-SÁEZ L. 2005. «Active mesopelagic prokaryotes support high respiration in the subtropical northeast Atlantic Ocean». *Geophys. Res. Lett.* Vol. 32, L03608, 4 pp.
- CARRIT, D. E., J. H. CARPENTER. 1966. «Comparison and evaluation of currently employed modification of the winkler method for determining dissolved oxygen in sea-water». *J. Mar. Res.* 24: 286-318.
- CARPENTER, J. H. 1965. «The Chesapeake Bay Institute. Technique for the winkler oxygen method». *Limnol. Oceanogr.* 10: 141-143.
- GRASSHOFF, K., M. EHRHARDT, K. KREMLING. 1983. *Methods of Seawater Analysis*. Eds Verlag Chemie GmbH. 419 pp.
- KELL, G. S. 1975. «Density, Thermal Expansivity, and Compressibility of Liquid Water from 0° to 150 °C: Correlations and Tables for Atmospheric



- Pressure and Saturation Reviewed and Expressed on 1968 Temperature Scale». *J. Chem. Eng. Data*. 21: 91-105.
- STRICKLAND, J. D. H., T. R. PARSONS. 1968. «Determination of dissolved oxygen in A Practical Handbook of Seawater Analysis». *J. Fish. Res. Board*. 167: 71-75.
- WEAST, R. C. 1973. *Handbook of chemistry and physics*. 59<sup>th</sup> Ed. CRC Press. pp. 1978-1979.
- WILLIAMS, P. J. LEB., N. W. JENKINSON. 1982. «A transportable microprocessor-controlled precise Winkler titration suitable for field station and siph-board use». *Limnol. Oceanogr.* 27 (3): 2843-2855.
- WINKLER, L. W. 1888. «Die Bestimmung des in Wasser gelösten Sauerstoffes». *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* 21: 2843-2855.



# Estudio de la cuantificación de CID por el plancton procariota mesopelágico ( $\geq 200$ m)

<sup>1</sup>Varela, M.; <sup>2</sup>Teira, E.; <sup>3</sup>Herndl, G.

<sup>1</sup>C.O. A Coruña. Instituto Español de Oceanografía

<sup>2</sup>Universidad de Vigo

<sup>3</sup>Universidad de Viena

## Conceptos generales

Las fuentes de carbono y energía de los procariotas son tema de debate actual. Algunas investigaciones indican que las *Crenarchaeota* son heterotróficas, y consumen activamente aminoácidos. Sin embargo el cultivo y aislamiento de *Nitrosopumilus maritimus* también mostró que algunas *Crenarchaeota* son capaces de oxidar amonio como fuente de energía, y fijar carbono inorgánico (metabolismo autotrófico). En este sentido, el análisis genómico de *Crenarchaeota* indicó que el gen que codifica para la oxidación de amonio (*amoA*) es 10 veces más abundante en *Crenarchaea* que en Bacteria. Sin embargo, mediante la técnica de hibridación in situ fluorescente combinada con microautoradiografía (MICRO-CARD-FISH) se descubrió que la fijación de carbono inorgánico está muy extendida tanto en Bacteria como en *Crenarchaeota*. Actualmente se desconoce cuánto carbono inorgánico es fijado por Bacteria vs. *Archaea* y qué grupos bacterianos están implicados en dicha fijación de CID.

## Finalidad. Campo de aplicación

Cuantificación de la fijación de CID por el plancton procariota mesopelágico, *Archaea* vs. Bacteria.

## Equipamiento necesario

Las muestras se toman directamente de las botellas oceanográficas convencionales de 12 l de capacidad montadas en una roseta oceanográfica.

Tras la incubación con bicarbonato marcado radioactivamente ( $^{14}\text{C}$ ) y la posterior fijación de las muestras, es necesario un equipo de filtración múltiple equipado con embudos de extensión para 100 ml de muestra y una bomba de vacío. Se utilizará un sistema completo (bomba más colector múltiple):



Bomba de vacío.



Equipo de filtración múltiple.



Equipo de filtración con embudos de extensión.

## Descripción de la técnica

*Toma de muestras y fijación de las mismas:* las muestras se recogerán directamente de las botellas de la roseta en tubos estériles desechables de 50 ml. Se tomarán 40 ml (tres réplicas) para las muestras vivas y 40 ml para los controles ("killed control", también tres réplicas) en aguas mesopelágicas (200-1000 m). Se tomarán dos sets de estas muestras, añadiendo a uno de ellos Eritromicina (un inhibidor de Bacteria) a una concentración final de  $10 \text{ mg ml}^{-1}$ , con el objetivo de cuantificar la fijación de CID por *Archaea*. Al otro set de muestras no se añadirá Eritromicina y se cuantificará la fijación de CID por toda la comunidad procariota (Bacteria + *Archaea*). A continuación se añade formaldehído al 37% libre de partículas hasta una concentración final del 2-4% a los controles. Tras 15 minutos se inocula el sustrato marcado radiactivamente según se indica a continuación.

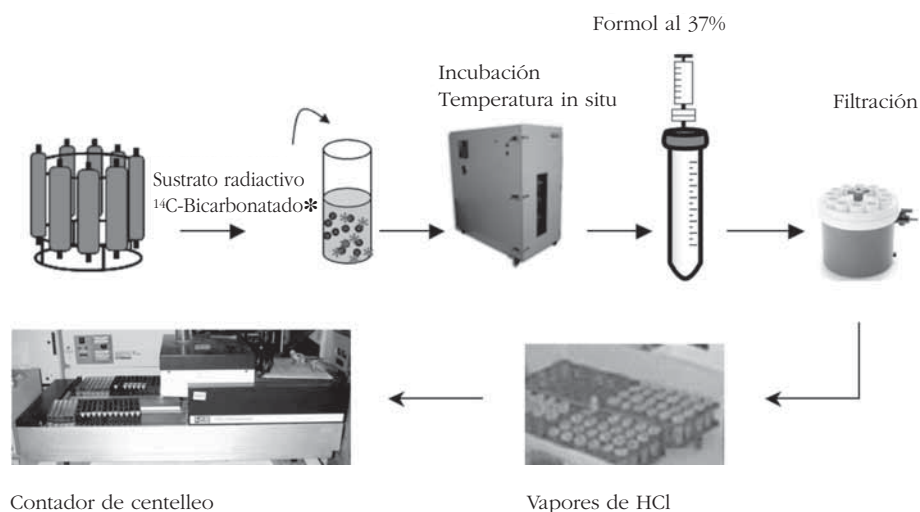
- Bicarbonato sódico marcado con  $^{14}\text{C}$  (actividad específica aproximada de  $50 \text{ mCi mmol}^{-1}$ ): añadir  $50 \text{ }\mu\text{Ci}$  por cada 40 ml de muestra.

A continuación incubar las muestras manteniéndolas a la temperatura in situ 48 h. Para finalizar la incubación se fijan las muestras añadiendo formaldehído al 37% libre de partículas (utilizando una jeringuilla y un filtro de 0.2 micras desechable) hasta una concentración final del 2-4%.

*Filtrado de las muestras:* la filtración se llevará a cabo en una instalación radioactiva. Antes de la misma se añadirán unas gotas de agua ultra-

pura (Milli-Q o similar) en las posiciones del sistema de filtración si estuviera seco. Colocar filtros de polycarbonato de  $0.2\ \mu\text{m}$  en el colector de filtración. Una vez filtradas las muestras, lavar los filtros tres veces con 10 ml de agua de mar filtrada, y tras la filtración se introduce el filtro con cuidado en viales de 2 ml con su extremo inferior perforado (para permitir que el HCl difunda hacia los filtros). A continuación, ir a la campana y descontaminar las muestras (eliminar el CID que no ha sido incorporado por las células). Para ello, la gradilla con todos los viales debidamente etiquetados y ordenados se guarda herméticamente en un recipiente que contiene HCl 50% depositado en placas de petri, colocadas en la base de dicho receptáculo. Los filtros se exponen a vapores de HCl concentrado durante 12 h. Finalmente, los filtros se transfieren a viales de centelleo de 5 ml y la radioactividad retenida en cada filtro se mide utilizando un contador de centelleo líquido.

### Cuadro sinóptico de la técnica



### Reactivos u otro material fungible

- Tubos de vidrio de 50 ml.
- Conservantes: Formaldehído al 37%.
- Inhibidor: Eritromicina.
- Jeringuillas desechables de 20 y 50 ml.
- Filtros estériles desechables de  $0.2\ \mu\text{m}$  (para la prefiltración del formol).
- Filtros de polycarbonato blancos de  $0.2$  y de  $25\ \text{mm}$  de diámetro.

- Viales de 2 ml.
- Viales de centelleo.
- Sustratos radiactivos  $^3\text{H}$ -Leucina y  $^{14}\text{C}$ -Bicarbonato.

### Control de calidad

Se harán chequeos continuos de los contajes de la radioactividad (expresados en DPM, desintegraciones por minuto) en cada uno de los legs, asegurándonos de que hay una baja variabilidad entre las 3 réplicas de cada muestra y que las DPM de los controles son inferiores a las DPM de la muestra.

## Actividad enzimática de los procariotas planctónicos

Ayo, B.; Abad, N.; Baña, Z.; Azua, I.; Unanue, M.; Iriberry, J.

*Dpto. Inmunología, Microbiología y Parasitología, Universidad del País Vasco*

### Finalidad. Campo de aplicación

Metodología para determinar el nivel y características de la actividad enzimática de los procariotas heterótrofos planctónicos. Se describe la técnica basada en la hidrólisis enzimática de sustratos fluorogénicos modelo (Hoppe, 1983). Estos sustratos consisten en una molécula fluorescente artificial (fluorocromo) unida a otro compuesto (por ejemplo, glucosa, fosfato, amino ácido, etc.) mediante un enlace específico (enlace éster, enlace peptídico, etc.). Estas moléculas son hidrolizadas por los enzimas de modo similar a los sustratos naturales oligoméricos o poliméricos, y cuando esto ocurre, el fluorocromo liberado genera fluorescencia. La cantidad de fluorescencia liberada (incremento de fluorescencia), determinada mediante fluorimetría, indica el nivel de actividad enzimática en la muestra de agua.

Las características generales de la técnica propuesta son las siguientes:

- Los sustratos fluorogénicos modelo no son tóxicos para la comunidad procariota natural.
- Los sustratos fluorogénicos modelo son artificiales: diferentes en tamaño, estructura y complejidad espacial a los sustratos naturales. Además, son hidrolizados principalmente por los exoenzimas, en tanto que los compuestos naturales son atacados tanto por exoenzimas como por endoenzimas. Debemos por tanto asumir, al utilizar esta técnica, que las velocidades de hidrólisis de estos sustratos son asimilables a las velocidades de hidrólisis de los sustratos naturales.
- Las concentraciones in situ de los sustratos naturales son habitualmente desconocidas, pero como estos sustratos son competitivos

frente a los sustratos naturales, los estudios se realizan habitualmente bajo concentraciones saturantes, de modo que los resultados obtenidos representan velocidades potenciales de hidrólisis.

- La utilización de concentraciones diferentes de sustrato permite determinar características cinéticas de los enzimas estudiados, representadas por los parámetros cinéticos  $K_m$  y  $V_{max}$ .
- La técnica implica la utilización de períodos de incubación variables, a fin de obtener incrementos significativos en el nivel de fluorescencia de la muestra.

### Conceptos generales

Una gran parte de la materia orgánica disuelta del océano está compuesta por moléculas poliméricas tales como proteínas, hidratos de carbono, grasas, etc. (Benner et ál. 1992; Chrost, 1993), y los procariotas heterótrofos son los principales responsables de su degradación (Hoppe et ál. 1993). Los procariotas heterótrofos no pueden consumir estos materiales directamente porque les resultan demasiado grandes, pero en cambio sí pueden romper estas macromoléculas mediante enzimas y consumir las pequeñas moléculas resultantes, tales como aminoácidos, pequeños azúcares, etc. Esta rotura debe ser realizada fuera de las células, y para ello, los procariotas son capaces de sintetizar y expulsar del citoplasma celular dos tipos de enzimas hidrolíticos. Los enzimas que se quedan en el periplasma o adheridos a las envolturas celulares se denominan ectoenzimas, mientras que los que son liberados al exterior se denominan enzimas extracelulares. Una vez rotas las macromoléculas mediante la actividad ectoenzimática y/o extracelular, los procariotas consumen las pequeñas moléculas liberadas, crecen y se reproducen. Esta hidrólisis enzimática es un proceso clave porque los procariotas heterótrofos son los principales organismos no autótrofos del océano capaces de transformar materia orgánica en forma disuelta en materia orgánica en forma particulada, es decir, en nuevos procariotas. Una vez formados los procariotas, estos podrán ser consumidos por otros organismos cada vez más grandes, flagelados, ciliados, zooplancton, peces y mamíferos, a lo largo de la cadena trófica del océano.

En este proyecto vamos a medir cuatro actividades enzimáticas (ectoenzimas y enzimas extracelulares):

- la actividad aminopeptidasa, que nos indicará cómo rompen estos procariotas las proteínas. La actividad aminopeptidasa se analizará con el análogo L-Leucina-7-amino-4-metil-cumarina (MCA-L). Este análogo es hidrolizado por varios enzimas, no solo por las leucina-aminopeptidasas. Se puede considerar como un sustrato modelo para la hidrólisis de una gran variedad de péptidos (Flint y Hopton, 1977).
- la actividad fosfatasa alcalina, capaz de hidrolizar ésteres orgánicos de fósforo. La actividad de estos enzimas se analizará con el análogo



fosfato de 4-metil-umbeliferona (MUF-P), que presenta velocidades de hidrólisis similares a los sustratos naturales (Berman, 1988; Hoppe, 1993).

- la actividad  $\beta$ -glucosidasa, que rompe carbohidratos con enlaces tipo  $\beta$  entre los azúcares, como por ejemplo la celulosa. La actividad de estos enzimas se analizará con el análogo 4-metil-umbeliferil  $-\beta$ -D-glucósido (MUF-G).
- la quitinasa, que hidroliza los enlaces de la quitina, un polisacárido estructural producido por muchos organismos marinos. La actividad de estos enzimas se analizará con un análogo fluorogénico de la quitina, el 4-metil-umbeliferil-N-acetil- $\beta$ -D-glucosamina (MUF-C).

Esta información permitirá conocer la importancia de los procariotas en el flujo de materia y energía en el Océano Global y, principalmente, en el océano profundo.

### Equipamiento necesario

- Lector de microplacas equipado con sonda superior de lectura de fluorescencia, equipado al menos con una fuente de luz de excitación de 350 nm de longitud de onda y capaz de medir fluorescencia a 445 nm de longitud de onda. El lector debería ser capaz de leer microplacas estándar de 96 pocillos, con un volumen de muestra de 250  $\mu$ l por pocillo.
- Si el lector no dispone de agitador interno de placas, un vórtex con plataforma adaptado para mezclar placas estándar de 96 pocillos.
- Congelador a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Almacenamiento de sustratos fluorogénicos.
- Frigorífico a  $4^{\circ}\text{C}$ . Almacenamiento de sustratos fluorogénicos.
- Incubadores a varias temperaturas. Incubación de las muestras de agua a temperatura in situ.
- Vórtex. Homogeneización de soluciones.

### Reactivos u otro material fungible

#### 1. Material fungible

- Botellas de muestreo de policarbonato de 500 ml de capacidad, con tapón.
- Contenedores de policarbonato de 125 ml de capacidad, con tapa.
- Reservorios para pipeteado multicanal, con tapa.
- Microplacas de 96 pocillos negras con tapa, estériles.
- Pipeta automática multicanal de 12 canales de 20-300  $\mu$ l.
- Pipeta automática multicanal de 12 canales de 5-20  $\mu$ l.

- Pipetas automáticas en el rango 10-5000  $\mu\text{l}$ .
- Puntas de pipeta estériles.
- Jeringas estériles de 20 ml.
- Filtros de jeringa de baja adsorción proteica, de 0.1  $\mu\text{m}$  de tamaño de poro, estériles.
- Crioviales de 2 y 5 ml de capacidad, de rosca externa, estériles.
- Gradillas para crioviales.
- Cajas de congelación para crioviales.
- Guantes sin polvo.

## 2. Reactivos

- Agua ultrapura (Milli-Q o similar).
- L-Leucina-7-amino-4-metil-cumarina (MCA-L).
- fosfato de 4-metil-umbeliferona (MUF-P).
- 4-metil-umbeliferil- $\beta$ -D-glucosido (MUF-G).
- 4-metil-umbeliferil-N-acetil- $\beta$ -D-glucosamina (MUF-C).
- 7-amino-4-metil cumarina (MCA).
- 4-metil-umbeliferona (MUF).
- Metanol absoluto.
- HCl 35%.

## 3. Preparación de soluciones Standing Stock (SS) de los sustratos y de los productos:

- Solución MCA-L SS: Solución 50 mM de MCA-Leu en Metanol 40%.
  - Preparación: disolver la cantidad correspondiente del sustrato en metanol 40%. Agitar hasta su completa disolución. Alicuotar en crioviales y congelar a -20 °C hasta su uso.
- Solución MUF-P SS: Solución 10 mM de MUF-P en Metanol 40%.
  - Preparación: disolver la cantidad correspondiente del sustrato en metanol 40%. Agitar hasta su completa disolución. Alicuotar en crioviales y congelar a -20 °C hasta su uso.
- Solución MUF-G SS: Solución 10 mM de MUF-G en Metanol 40%.
  - Preparación: disolver la cantidad correspondiente del sustrato en el volumen de agua ultrapura correspondiente. Agitar hasta su completa disolución. Añadir la cantidad de metanol absoluto necesaria. Alicuotar en crioviales y congelar a -20 °C hasta su uso.
- Solución MUF-C SS: Solución 10 mM de MUF-C en Metanol 40%.
  - Preparación: disolver la cantidad correspondiente del sustrato en metanol 40%. Agitar hasta su completa disolución. Alicuotar en crioviales y congelar a -20 °C hasta su uso.

- Solución MCA SSx1000: Solución 4.8 mM de MCA en Metanol 40%.
    - Preparación: disolver la cantidad correspondiente del producto en el volumen de metanol absoluto correspondiente. Agitar hasta su completa disolución. Añadir la cantidad de agua ultrapura necesaria. Alicuotar en crioviales y congelar a -20 °C hasta su uso.
  - Solución MUF-P SSx1000: Solución 2.4 mM de MUF en Metanol 40%.
    - Preparación: disolver la cantidad correspondiente del producto en el volumen de metanol absoluto correspondiente. Agitar hasta su completa disolución. Añadir la cantidad de agua ultrapura necesaria. Alicuotar en crioviales y congelar a -20 °C hasta su uso.
4. Preparación de soluciones de trabajo “Working solutions” (WS) de los sustratos y de los productos:
- Las soluciones de trabajo (WS) se preparan diluyendo las soluciones “Standing Stock” con agua ultrapura hasta conseguir una concentración tal que al añadir 10 µl de la WS a un volumen de 240 µl de muestra, se alcanza la concentración deseada en ésta última.
  - La concentración en muestra de los sustratos varía en función del análisis a realizar:
    - actividad potencial, en la que se utilizan concentraciones saturantes: 250-1000 µM para la actividad aminopeptidasa, y 98-250 µM para las actividades fosfatasa alcalina, β-glucosidasa y quitinasa.
    - estudio cinético, en el que se utiliza un rango de 10 concentraciones en los intervalos de 1.9-1500 µM para la actividad aminopeptidasa, y 0.7-400 µM para las actividades fosfatasa alcalina, β-glucosidasa y quitinasa.
  - La concentración en muestra de los productos fue de 0-96 µM en el caso de la MCA y de 0-48 µM en el caso del MUF.

## Calibración

Para cada muestra de agua analizada, se calibrará la relación entre las unidades de fluorescencia y la concentración de los dos productos que pueden ser generados, en función del sustrato utilizado. Estos dos productos son MCA y MUF.

Cada calibración generada se aplicará a los resultados específicos de esa muestra.

Las concentraciones de los dos productos que se utilizarán para las calibraciones son:

- MCA: 96 nM, 24 nM, 6 nM y 0 nM.
- MUF: 48 nM, 12 nM, 3 nM y 0 nM.

## Descripción de la técnica

### Muestreo

Las muestras de agua se recogerán de las botellas Niskin en botellas de policarbonato lavadas con ácido (HCl 3.5% 24 horas, aclaradas 3 veces con agua destilada y dos veces con agua ultrapura), de 500 ml de capacidad. Las botellas estarán previamente identificadas como “TOTAL SAMPLE”, con el número de estación y profundidad.

Un volumen adecuado de la muestra será filtrado a través de 0.1  $\mu\text{m}$ , a fin de eliminar todo el material particulado de la misma. El filtrado se recogerá en una botella identificada como “FILTERED SAMPLE”, con el número de estación y profundidad.

### Preparación de sustratos y productos

Las soluciones Standing Stock (SS) de los sustratos y productos deben ser descongeladas a temperatura ambiente. A partir de estas soluciones SS, se obtendrán volúmenes adecuados de las soluciones de trabajo (WS) mediante dilución en agua ultrapura. Las soluciones de trabajo se distribuirán en pocillos de una microplaca denominada “master plate”, que será mantenida a 4 °C hasta su uso.

### Mezcla de soluciones de trabajo con la muestra

El análisis de la actividad enzimática de una muestra de agua se realizará en una o más microplacas, que serán denominadas teniendo en cuenta el número de estación, la profundidad, el tipo de estudio a realizar, la presencia de muestra Total y/o Filtrada, el tipo de actividad analizado y, por último, la temperatura a la que debe ser incubada la placa.

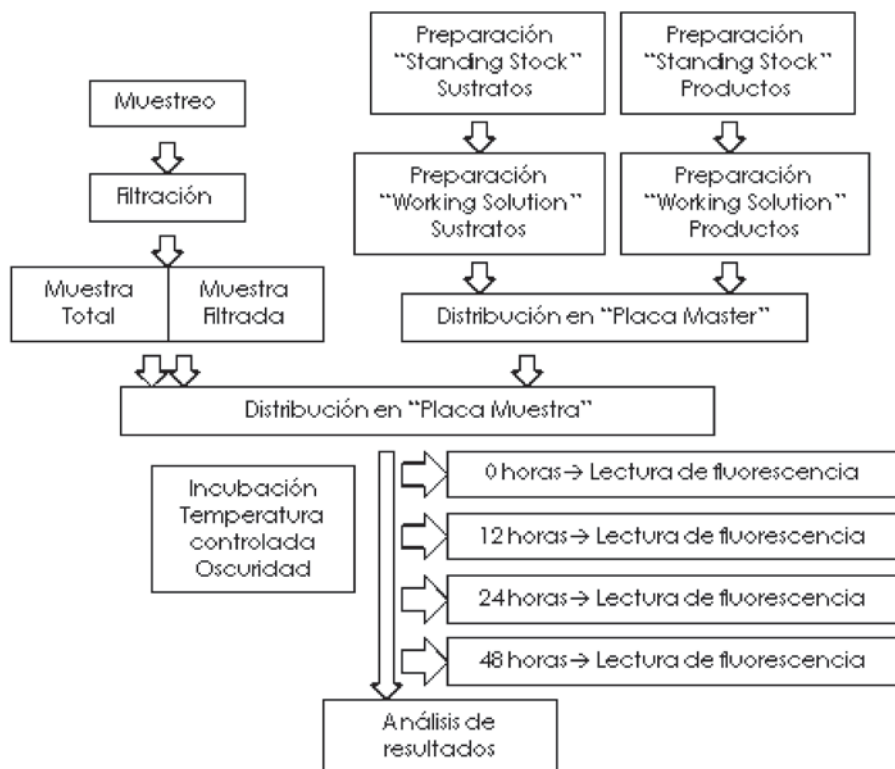
A cada uno de los pocillos de estas microplacas se añadirán:

- 10  $\mu\text{l}$  de WS, procedentes de la “master-microplate”.
- 240  $\mu\text{l}$  de muestra, Total o Filtrada.

### Medida de la fluorescencia de la muestra

Una vez preparada la placa, se realizará la primera medida de fluorescencia en los pocillos mediante el lector de microplacas utilizando una longitud de onda de excitación de 365 nm y una longitud de emisión de 445 nm. Una vez realizada la medida, las placas se incubarán a la temperatura adecuada hasta las siguientes medidas de fluorescencia, que se realizarán al cabo de 12 h, 24 h y 48 h.

### Cuadro sinóptico de la técnica



### Cálculo de los resultados

El proceso de cálculo se esquematiza a continuación:

- Analizar replicados para la detección y supresión de “outliers”.
- Calcular el incremento de fluorescencia en cada pocillo a lo largo de las 48 horas de incubación.
- Establecer la linealidad de las medidas.
- Calcular el incremento de fluorescencia en cada pocillo por hora.
- Calcular los valores medios de incremento de fluorescencia por hora para cada análisis.
- Calibrar la determinación de unidades de fluorescencia frente a la concentración de los productos.
- Convertir las unidades de fluorescencia en concentración de producto generado.

## Control de calidad

El buen funcionamiento del aparato se debe chequear diariamente mediante la comparación de los estándares de calibración y fluorescencia inicial de las muestras mezcladas con el correspondiente sustrato. Aunque la fluorescencia varía ligeramente en función de la muestra y temperatura de medida, las desviaciones significativas en la cantidad de fluorescencia inicial pueden usarse para detectar errores de pipeteo o deterioro de las soluciones de calibración o de sustrato utilizadas.

## Referencias

- BENNER, R., J. D. PAKULSKI, M. MCCARTHY, I. HEDGES, P. G. HATCHER. 1992. «Bulk chemical characteristics of dissolved organic matter in the ocean». *Science* 255: 1561-1564.
- BERMAN, T. 1988. «Differential uptake of orthophosphate and organic phosphorus substrates by bacteria and algae in Lake Kinneret». *J. Plankton Res.* 10: 1239-1249.
- CHROST, R. J. 1993. «Enzymatic transformation of organic matter in aquatic environments». En: GUERRERO, R., PEDRÓS-ALIÓ, C. (eds.), *Trends in Microbial Ecology*, Spanish Society for Microbiology, pp. 401-106.
- FLINT, K. P., J. W. HOPTON. 1977. «Substrate-specificity and ion inhibition of bacterial and particle associated alkaline-phosphatases of waters and sewage sludges». *Eur. J. Appl. Microbiol.* 4: 195-204.
- HOPPE, H.-G. 1983. «Significance of exoenzymatic activities in the ecology of brackish water: Measurements by means of methyl-umbelliferyl-substrates». *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 11: 299-308.
- 1993. «Use of fluorogenic model substrates for extracellular enzyme activity (EEA) measurement of bacteria». En: KEMP, P. F., SHERR, B. F., SHERR, E. B., COLE, J. J. (eds.), *Handbook of methods in aquatic microbial ecology*. Lewis Publishers, pp. 423-432.
- HOPPE, H.-G., S.-J. KIM, K. GÖCKE. 1988. «Microbial decomposition in aquatic environments: combined process of extracellular enzyme activity and substrate uptake». *Appl. Environ. Microbiol.* 54: 784-790.

## Estudio de la actividad del plancton procariota profundo ( $\geq 100$ m)

<sup>1</sup>Varela, M.; <sup>2</sup>Teira, E.

C.O. A Coruña. Instituto Español de Oceanografía  
Universidad de Vigo

### Conceptos generales

A pesar del avance producido en el conocimiento de la diversidad procariota marina y el papel de los procariotas en el ciclo del carbono oceánico, se sabe muy poco sobre la relación entre estas dos importantes características en condiciones naturales. El estudio de esta relación se ha visto impedido por la dificultad para obtener cultivos puros de los organismos representativos del medio, y así poder disponer de información sobre sus capacidades metabólicas. Por ejemplo, hasta la fecha solo existe una arquea marina pelágica no extremófila, *Candidatus N. maritimus* que ha podido ser cultivada. Una de las técnicas que se ha conseguido aplicar con gran éxito para determinar la abundancia de los procariotas y su actividad metabólica es la combinación del FISH con la microautoradiografía (MICRO-FISH). El método permite el estudio de la incorporación de diferentes sustratos por diferentes grupos de procariotas a nivel de célula individual. La aplicación de esta técnica ha permitido demostrar que diferentes poblaciones bacterianas llevan a cabo distintos patrones de uso de carbono, lo que sugiere que los grupos bacterianos no son equivalentes en el uso del carbono. Además, esta técnica nos ha permitido revelar que un porcentaje considerable de las arqueas que habitan las capas profundas del océano están metabólicamente activas, y son capaces de incorporar tanto sustratos orgánicos como inorgánicos. Por otro lado, y mediante análisis de imagen acoplado a microscopía de epifluorescencia se ha podido aplicar la técnica de MICRO-FISH de manera también cuantitativa, determinando las diferencias intra- e interespecíficas en el crecimiento de células individuales de la comunidad planctónica procariota.

## Finalidad. Campo de aplicación

Metodología para estudios de actividad a nivel de célula individual de plancton procariota profundo en una estación de muestreo determinada.

## Equipamiento necesario

Las muestras se toman directamente de las botellas oceanográficas convencionales de 12 l de capacidad montadas en una roseta oceanográfica. Tras la incubación con sustancias radioactivas ( $^3\text{H}$ -Leucina y  $^{14}\text{C}$ -Bicarbonato) y la posterior fijación de las muestras, es necesario un equipo de filtración múltiple equipado con embudos de extensión para 100 ml de muestra y una bomba de vacío. Se utilizarán 2 sistemas completos (bomba y un colector múltiple): uno para el MICRO-FISH con  $^3\text{H}$  y otro para el MICRO-FISH con  $^{14}\text{C}$ .



Bomba de vacío.



Equipo de filtración múltiple.



Equipo de filtración con embudos de extensión.

## Descripción de la técnica

*Toma de muestras y fijación de las mismas:* Las muestras se recogerán directamente de las botellas de la roseta en tubos estériles desechables de 50 ml. Dependiendo de la profundidad se tomarán entre 40 y 80 ml de muestra. En general se tomarán 40 ml en aguas subsuperficiales (~100 m) y mesopelágicas (200-1000 m) y 80 ml (2 tubos de 50 ml) en aguas batipelágicas (>1000 m). Se recogerán también muestras para realizar controles fijados ("killed control"). A continuación se añade formaldehído al 37% libre de partículas (utilizando una jeringuilla y un filtro de 0.2 micras desechable) hasta una concentración final del 2-4% solo a los controles. Tras 15 minutos se inoculan los sustratos marcados radiactivamente tanto en las muestras como en los controles según se indica a continuación.

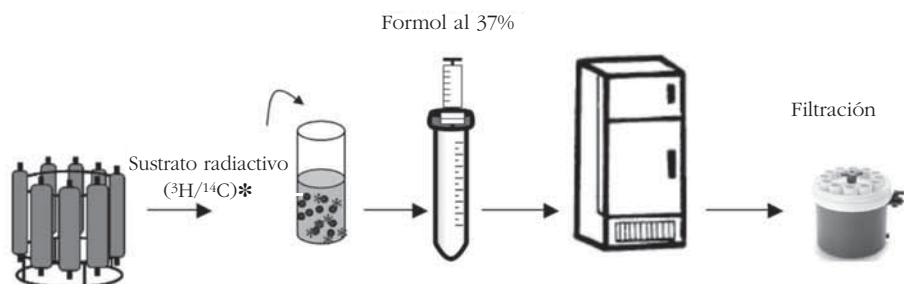


- Leucina marcada con  $^3\text{H}$  (actividad específica de entre 140 y 160 Ci mmol $^{-1}$ ): añadir el volumen adecuado hasta una concentración final de 1 nM (~100 m), 5 nM (200-1000m) y 10 nM (>1000m).
- Bicarbonato sódico marcado con  $^{14}\text{C}$  (actividad específica aproximada de 50 mCi mmol $^{-1}$ ): añadir 50  $\mu\text{Ci}$  (100-1000 m) y 100  $\mu\text{Ci}$  (>1000 m).

A continuación incubar las muestras manteniéndolas a la temperatura in situ y en oscuridad entre 6 y 24 h para la leucina; o 48-72 horas en el caso del bicarbonato sódico. Para finalizar la incubación se fijan las muestras añadiendo formaldehído al 37% libre de partículas hasta una concentración final del 2-4%. A continuación se mantienen las muestras en oscuridad y a 4 °C (en nevera) al menos 12 horas y no más de 24 h antes de proceder al filtrado.

*Filtrado de las muestras:* La filtración se llevará a cabo en una instalación radioactiva. Antes de la misma se añadirán unas gotas de agua ultrapura (Milli-Q o similar) en las posiciones del sistema de filtración si estuviera seco. Colocar filtros de nitrocelulosa de 0.8  $\mu\text{m}$  en las posiciones del sistema de filtración. A continuación, se colocan encima los filtros de polycarbonato de 0.2  $\mu\text{m}$  con la cara brillante hacia arriba. Una vez filtradas las muestras, lavar los filtros dos veces con 10 ml de agua ultrapura. Dejar secar los filtros colocándolos con cuidado sobre papel absorbente (manteniendo siempre la cara brillante hacia arriba). Una vez secos, se introduce el filtro con cuidado en tubos debidamente etiquetados de 2 ml (asegurándose que la cara brillante, aquella que contiene las células está hacia dentro) y se almacenan los tubos en las cajas de congelación debidamente etiquetadas a -20 °C.

### Cuadro sinóptico de la técnica



## Reactivos u otro material fungible

- Tubos Falcon de 50 ml estériles.
- Conservantes: Formaldehído al 37%.
- Jeringuillas desechables de 20 y 50 ml.
- Filtros estériles desechables de 0.2  $\mu\text{m}$  (para la prefiltración del formol).
- Filtros de nitrocelulosa de 0.8  $\mu\text{m}$  y de 25 mm de diámetro.
- Filtros de policarbonato blancos de 0.2 y de 0.6  $\mu\text{m}$  y de 25 mm de diámetro.
- Viales para centrifuga de 2 ml.
- Cajas de congelación de cartón para viales de 2 ml.
- Portaobjetos y cubreobjetos.
- Sustratos radiactivos:  $^3\text{H}$ -Leucina y  $^{14}\text{C}$ -Bicarbonato.

## Control de calidad

Se tratará de hacer chequeos mediante microscopía. Para ello se filtra un volumen determinado de muestra tal como se ha explicado. Una vez seco el filtro, colocarlo en un portaobjetos, añadir una gota de la mezcla de DAPI, colocar un cubreobjetos y observar la muestra en un microscopio de epifluorescencia equipado con filtros adecuados para la observación del DAPI. La densidad óptima de células recogidas sobre los filtros para el procesamiento posterior de los filtros en el caso del plancton procariota es de entre 100-300 células en un área de  $10^4 \mu\text{m}^2$ .

# Determinación de la depredación bacteriana debida a protistas, mediante la desaparición en el tiempo de trazadores (bacterias marcadas con un compuesto fluorescente, FLB: *fluorescent labeled bacteria*)

Vaqué, D.; Boras, J. A.; Lara, E.; Sà, E. L.

*Institut de Ciències del Mar (CSIC)*

## Finalidad. Campo de aplicación

El objetivo de este experimento es medir las pérdidas de bacterias debido a su ingestión por parte de protistas. Dichos experimentos se realizarán al mismo tiempo que los de Producción Vírica, con el fin de obtener datos comparativos sobre los dos tipos de mortalidad de bacterias (depredación vs. lisis).

## Conceptos generales

En los sistemas marinos oligotróficos las comunidades de procariotas están constituidas principalmente por bacterias heterótrofas y fotoautótrofas (*Synechococcus* y *Prochlorococcus*) y algunas Arqueas. Las bacterias heterótrofas representan un elevado porcentaje de la biomasa respecto a otros organismos plantónicos (fitoplancton, protozoos, zooplancton, Gasol et ál. 1997) y juegan un papel muy importante en el reciclaje de la materia orgánica disuelta en el mar. Así, captan el carbono orgánico disuelto excretado por el fitoplancton y lo convierten en particulado entrando a formar parte de la dieta básica de protozoos, constituyendo el bucle microbiano. En cambio las bacterias autótrofas utilizan CO<sub>2</sub> y nutrientes inorgánicos disueltos en el agua necesarios para la fotosíntesis y su crecimiento. Estos microorganismos también forman parte del flujo de carbono que pasa a niveles tróficos superiores, principalmente protozoos (nanoflagelados heterótrofos). El papel que juegan los protozoos como reguladores de la biomasa de procario-

tas empieza a ser reconocido en la década de los 80s. El continuo avance en el desarrollo de técnicas que se utilizan para determinar: (i) abundancia de procariotas y protozoos por microscopia de epifluorescencia (Porter y Feig, 1980) y citometría de flujo (Gasol y Del Giorgio, 2000); (ii) producción de procariotas: uso de isótopos radiactivos (Kirchman, 1993); (iii) tasas de depredación de protozoos sobre procariotas, mediante técnicas de dilución (Landry et ál. 1984), fraccionamiento (Kuuppo-Leinikki y Kuosa, 1990), uso de trazadores fluorescentes (Sherr et ál. 1987, Pace et ál. 1990, Vaqué et ál. 1994, Vázquez-Domínguez et ál. 1999). Todo ello ha contribuido a mejorar el conocimiento y función de los microorganismos integrantes de las redes tróficas microbianas y a cuantificar los flujos de carbono que se establecen entre los distintos microorganismos en los sistemas marinos.

### Equipamiento necesario

- Sistema de filtración para filtros de 25 mm.
- Bomba de vacío y trampa.
- Baño de ultrasonidos.
- Congelador de -20 °C.
- Incubadores (baños en cubierta, o cámaras termostatzadas).

### Reactivos u otro material fungible

- Glutaraldehido para fijación de muestras (10%).
- Solución de DAPI (5 µg l<sup>-1</sup>, concentración final).
- Pipetas automáticas (5 ml, 1 ml, 50 µl).
- Puntas de pipeta (5 ml, 1 ml, 50 µl).
- Tubos de plástico para el sistema de filtración.
- Portas y cubres.
- Lápiz para marcar los portas.
- Guantes.
- Cajas para guardar las preparaciones.
- Botellas de plástico, para recoger las submuestras.
- Botellas estériles para incubaciones (1 a 2 l).
- Solución de trabajo de bacterias marcadas con un compuesto fluorescente (DTAF, Sigma).

### *Preparación de las bacterias marcadas (solución stock)*

- A partir de un cultivo en placa de agar de *Brevundimonas diminuta* dejado envejecer al menos dos semanas, se rascan las colonias y se suspenden en un tampón carbonato– bicarbonato (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> - HNaCO<sub>3</sub>).

- La suspensión se hace en 10 tubos eppendorfs, añadiendo 1 ml del tampón en cada uno.  
Solución tampón: 1 volumen de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , 0.5 N y 3 volúmenes de  $\text{HNaCO}_3$ , 0.5N.  
 $\text{Na}_2\text{CO}_3$  0.5 N (5.3 g/100 ml de agua destilada filtrada por 0.2  $\mu\text{m}$ ).  
 $\text{HNaCO}_3$ , 0.5 N (4.2 g/100 ml de agua destilada filtrada).
- Esterilizar la solución por filtración (a través de 0.2  $\mu\text{m}$ ) antes de añadirla a viales eppendorfs.
- Para su tinción a cada eppendorff donde hay la solución de *B. diminuta* con el tampón añadir 100  $\mu\text{g ml}^{-1}$  de DTAF concentración final, diluida previamente con la solución tampón).
- Agitar cada vial con el vórtex (1 min).
- Incubar la suspensión de células (con el colorante) durante 2 horas en un baño a 60 °C.
- A las 2h, agitar de nuevo con el vórtex cada vial con las células teñidas
- Lavar las células teñidas centrifugando de 3 a 5 veces (10 min, 10000-12000 rpm). Después de cada centrifugación sacar el sobrenadante y resuspender el pellet con tampón bicarbonato previamente filtrado por 0.2  $\mu\text{m}$ . Con ello se pretende eliminar la cantidad sobrante de colorante.
- Sonicar todos los viales en un baño de ultrasonidos durante 15 min.
- Mezclar en un mismo vial de 10-20 ml el contenido de las soluciones teñidas de *B. diminuta* de los diferentes viales eppendorff. Esto será la solución STOCK.

### *Solución de trabajo*

- Sonicar la solución STOCK durante 5 minutos.
- Tomar 5 o 10  $\mu\text{l}$  de la solución STOCK y diluirla en 10 ml de tampón previamente filtrado por 0.2  $\mu\text{m}$ .
- Sonicar de nuevo la nueva solución durante 15 minutos y hacer una preparación para recuento al microscopio de epifluorescencia para saber exactamente su abundancia y observar que las bacterias marcadas están convenientemente teñidas y distribuidas en el filtro sin que hayan muchos agregados. Si se observan muchos agregados se recomienda sonicar de nuevo (ESTE PASO ES MUY IMPORTANTE).
- Generalmente la concentración de *B. diminuta* para la solución STOCK es aproximadamente del orden de  $10^9$ - $10^{10}$  células  $\text{ml}^{-1}$ .
- De la solución STOCK ( $\sim 10^9$  células  $\text{ml}^{-1}$ ) tomar 0.2 ml, ponerlos en crioviales y añadir 0.8 ml de tampón para obtener una concentración de trabajo del orden de  $2 \times 10^8$  de *B. diminuta* en cada vial. Guardarlas congeladas a -20 °C hasta su uso.
- La solución de trabajo de *B. diminuta* debería estar alrededor del 20-30% de la concentración de bacterias naturales.

- Lugol ácido

Disolver Yoduro de potasio (KI, 100 g), Yodo(I<sub>2</sub>, 50 g) y 100 ml de ácido acético en agua destilada (volumen final 1 l). Filtrar a través de un papel de filtro de laboratorio y guardar en oscuridad a temperatura ambiente o en nevera.

## Calibración

Los experimentos se calibran mediante un control, que consiste en una muestra de agua que no contiene depredadores (previamente filtrada por 0.6 µm), a la que se añaden las bacterias marcadas. Si no hay depredadores no desaparecerán a lo largo del tiempo.

## Descripción de la técnica

### a) Diseño del experimento:

- Tomar 2 l de muestra natural. De estos, filtrar solo medio litro por 0.6 µm.
- Para cada muestra, marcar 4 botellas limpias y una de ellas como control.
- Dispensar 0.5 l de la muestra natural en cada réplica, y el medio litro de la muestra filtrada por 0.6 µm en el control.
- Descongelar 2 ml de la solución de trabajo (2 viales) de FLBs y sonicarlos 15 minutos en el baño de ultrasonidos.
- Añadir las FLB a un tubo con 6 ml de agua filtrada por 0.2 µm. Sonicar de nuevo 15 minutos.
- Añadir a cada botella, réplicas y control, 2 ml de esta solución de FLBs. La concentración final de FLB en la muestra y control debe ser alrededor de  $1-2 \times 10^5$  cels ml<sup>-1</sup>.
- Rotar cuidadosamente las botellas (unas 20 veces) para homogeneizar bien las muestras con las FLBs.

### b) Muestreo del experimento en T<sub>0</sub> (inicial) y T<sub>48</sub> (dos días):

- El experimento se incubará durante 48 h en oscuridad a la temperatura in situ.
- En el T<sub>0</sub> se tomarán muestras para recuento de ciliados, bacterias heterotróficas/FLBs y nanoflagelados.
- En el T<sub>48</sub> solo para bacterias heterotróficas/FLB. Además, en el T<sub>48</sub> se tomará una muestra para Producción Bacteriana.

### c) Determinación de abundancias

- Abundancia de ciliados:

- Dispensar 100 ml de cada triplicado en botellas de vidrio. Fijar con 2 ml de lugol acético (2% concentración final). Conservar en un lugar fresco y oscuro hasta su llegada al centro de investigación, donde se observarán y contarán en un microscopio invertido a 400X. Los recuentos y medida de los distintos grupos de ciliados se harán después de haber sedimentado 100 ml de muestra en cubetas de sedimentación durante 24-48h.
- Abundancia de bacterias heterotróficas/FLB y nanoflagelados
  - Preparar glutaraldehído 10% (600 ml de agua ultrapura filtrada por 0.2  $\mu\text{m}$  y 400 ml de glutaraldehído 25%).
  - Conservar a 4 °C.
  - Dispensar 50 ml de réplicas y control en 4 botellas de plástico de 75 ml.
  - Fijar con 5 ml de glutaraldehído al 10% (concentración final 1%).
  - Mantener a 4 °C al menos 1 hora, o hasta que se proceda al protocolo de DAPI.

#### c1) Filtración de muestras y tinción con DAPI

- Para cada muestra fijada, filtrar lo siguiente para recuentos de muestras teñidas con DAPI:
  - T0) Filtrar, 10-15 ml para bacterias heterotróficas y FLBs (filtro de 0.2  $\mu\text{m}$ ) y 25-40 ml para nanoflagelados (filtro de 0.6  $\mu\text{m}$ ).
  - T48) Filtrar, 10-15 ml para bacterias heterotróficas y FLB (filtro de 0.2  $\mu\text{m}$ ). El volumen de filtración dependerá de la riqueza de cada área de muestreo.
- Tinción con DAPI para bacterias heterotróficas:
  - Preparar la solución de trabajo de DAPI (0.5 mg ml<sup>-1</sup>), acorde al protocolo descrito por el grupo de eucariotas (mismo volumen).
  - Montar la rampa para filtraciones tóxicas. Colocar un filtro de 0.8  $\mu\text{m}$  de acetato de celulosa como base, y humedecerlo con algunas gotas de agua ultrapura (Milli-Q). Sobre él, colocar el filtro negro de 0.2  $\mu\text{m}$  de policarbonato.
  - Colocar la torre de filtración y añadir la muestra fijada de 5 en 5 ml.
  - Filtrar hasta que queden los últimos 5 ml, entonces añadir 50  $\mu\text{l}$  de DAPI (0.5 mg mL<sup>-1</sup>, para llegar a una concentración final de 5  $\mu\text{g}$  ml<sup>-1</sup>).
  - Dejar teñir durante 5 minutos en oscuridad antes de filtrar los 5 ml restantes.
  - Montar la preparación poniendo una gota de aceite de inmersión en el porta, encima el filtro, sobre él otra gota de aceite de inmersión y por último el cubre.
  - Anotar los datos de cada muestra (estación, profundidad, fecha) en la parte biselada del porta con un rotulador de vidrio.

- Guardar las preparaciones en las cajas correspondientes a -20 °C (hasta proceder al recuento por microscopia de epifluorescencia a 1000X) y anotar los datos en el estadillo correspondiente.
- Las bacterias heterotróficas se observarán y contarán por epifluorescencia utilizando el filtro de radiación UV. En cambio el recuento de las FLB's se realizará utilizando el filtro de luz azul. Las primeras fluorescen en color azul y las segundas en color amarillo.
- Tinción de nanoflagelados con DAPI
  - Proceder de la misma forma que para bacterias heterotróficas pero con un filtro negro de 0.6  $\mu\text{m}$  de policarbonato. El volumen filtrado será en este caso de entre 25 y 40 ml. Los recuentos también se realizarán por epifluorescencia a 1000X. En este caso también se utilizarán los dos filtros para la identificación de células con y sin pigmentos fotosintéticos.

#### d) Producción bacteriana

(Mediante la incorporación de leucina tritiada, véase el protocolo correspondiente).

### Cuadro sinóptico de la técnica

1. Adición de FLBS a la muestra (20%-30% de la abundancia natural).
2. incubación de la muestra durante 48 h en oscuridad y a la temperatura in situ.
3. Tomar alícuotas al T=0 de cada una de las réplicas y control, para bacterias, FLB, flagelados y ciliados y T =48, para bacterias y FLB.
4. Preparaciones de los filtros con las correspondientes muestras de bacterias y protistas.
5. Recuento de protistas a tiempo cero y de bacterias/FLB a tiempos 0 y 48 h mediante microscopía de epifluorescencia.

### Cálculo de los resultados

La tasa de desaparición de FLB se utilizará para calcular las tasas de depredación mediante el modelo matemático descrito por Salat y Marrasé (1994) y utilizado en varios trabajos con posterioridad (por ejemplo, Vaqué et ál. 2001).

- Tasas de bacterivoría (G) como número de células consumidas  $\text{ml}^{-1} \text{d}^{-1}$  se calcula como sigue:

$$g = -1/t^* \ln (B. \dim_t / B. \dim_0)$$

g = tasa específica de bacterivoría ( $\text{d}^{-1}$ ) ; t = tiempo de incubación en días;

B.  $\dim_t$ : abundancia de B. diminuta al tiempo final ( $t_{48}$ );

B.  $\dim_0$ : abundancia de B. diminuta al tiempo inicial ( $t_0$ );



$$a = 1/t * \ln (BH_t/BH_0).$$

$a$  = tasa neta de crecimiento ( $d^{-1}$ );  $t$  = tiempo de incubación en días;

$BH_t$ : Abundancia de bacterias heterotróficas al tiempo final ( $t_{48}$ );

$BH_0$ : Abundancia de bacterias heterotróficas al tiempo cero.

Tasa de bacterivoría:  $G = g/a * \Delta BH_t$  = Número de bacterias consumidas  $ml^{-1} d^{-1}$

$*\Delta BH_t$  Incremento neto de bacterias a las 48h, y se calcula como:  
 $BH_0 * a - BH_0$

% de bacterias consumidas de la población inicial=  $G * 100 / BH$ .

## Referencias

- GASOL, J. M., P. A. DEL GIORGIO, C. M. DUARTE. 1997. «Biomass distribution in marine planktonic communities». *Limnol. Oceanogr.* 42: 1353-1363.
- GASOL, J. M., P. A. DEL GIORGIO. 2000. «Using flow cytometry for counting natural planktonic bacteria and understanding the structure of planktonic bacterial communities». *Sci. Mar.* 64: 197-224.
- KIRCHMAN, D. L. 1993. «Leucine incorporation as a measure of biomass production by heterotrophic bacteria». En: KEMP P. F., SHERR B. F., SHERR E. B., COLE J. J. (eds.). *Handbook of methods of aquatic microbial ecology*. Lewis Publishers, Boca Raton, pp. 509-512.
- KUUPPO-LEINIKKI, P., H. KUOSA. 1990. «Estimation of flagellate grazing on bacteria by size fractionation in the Northern Baltic Sea». *Arch., Hydrobiol. Beib. Ergebn. Limnol.* 34: 283-290.
- LANDRY, M. R., L. W. HAAS, V. L. FAGERNESS. 1984. «Dynamics of microbial plankton communities: experiments in Kaneohe Bay, Hawaii». *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 16: 127-133.
- PACE, M. L., G. B. MC MANUS, S. E. G. FINDLAY. 1990. «Planktonic community structure determines the fate of bacterial production in a temperate lake». *Limnol. Oceanogr.* 35: 795-808.
- PORTER, K. G., Y. S. FEIG. 1980. «The use of DAPI for identifying and counting aquatic microflora». *Limnol. Oceanogr.* 25: 943-948.
- SALAT, J., C. MARRASÉ C. 1994. «Exponential and linear estimations of grazing on bacteria: effects on changes in the proportion of marked cells». *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 104: 205-209.
- SHERR, B. F., E. B. SHERR, R. D. FALLON. 1987. «Use of monodispersed, fluorescently labeled bacteria to estimate in situ protozoan bacterivory». *Appl. Environ. Microbiol.* 53: 958-965.
- VAQUÉ, D., J. M. GASOL, C. MARRASÉ. 1994. «Grazing rates on bacteria: the significance of methodology and ecological factors». *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 109: 263-274.

- VAQUÉ, D., E. O. CASAMAYOR, J. M. GASOL. 2001. «Dynamics of whole community bacterial production and grazing losses in seawater incubations as related to the changes in the proportions of bacteria with different DNA-content». *Aquat. Microb. Ecol.* 25: 163-177.
- VÁZQUEZ-DOMÍNGUEZ E., J. M. GASOL, F. PETERS, D. VAQUÉ. 1999. «Measuring the grazing losses of picoplankton: methodological improvements to the use of fluorescently labeled tracers combined with flow cytometry». *Aquat. Microb. Ecol.* 20: 110-128.

# Determinación de la producción de virus como consecuencia de la lisis bacteriana

Vaqué, D.; Boras, J.A.; Lara, E.; Sà, E. L.

*Institut de Ciències del Mar (CSIC)*

## Finalidad. Campo de aplicación

La determinación de Producción Vírica se hará coincidir con los experimentos de depredación bacteriana, con el fin de obtener datos comparativos sobre la mortalidad de bacterias debida a virus frente a la mortalidad causada por depredación de protistas.

## Conceptos generales

Los virus son las partículas biológicas más abundantes del plancton marino. En el mar presentan abundancias entre  $10^6$ - $10^8$  células  $\text{ml}^{-1}$  (Suttle, 2007), tienen de 20 a 200 nm de longitud, y están constituidos por material genético (DNA ó RNA de cadena sencilla o doble, lineal o circular), rodeados por una cubierta de proteínas y algunos poseen lípidos. No tienen metabolismo propio y funcionan como parásitos utilizando la maquinaria celular del hospedador. Su supervivencia y reproducción se basa en la infección tanto de microorganismos procariotas (bacterias) como eucariotas. Hay básicamente tres tipos de reproducción vírica: (1) Infección lítica, el virus entra en contacto con la célula hospedadora y le inyecta su ácido nucleico, el cual determina la producción de una numerosa progenie de virus. En un momento dado, la célula hospedadora explota, los virus salen al exterior y el ciclo empieza de nuevo. (2) Infección crónica, cuando la progenie de virus liberados no es letal y la célula hospedadora excreta los virus por extrusión, o se desarrollan dentro de la misma durante varias generaciones. (3) Lisogenia, el ácido nucleico del genoma del virus pasa a formar parte del genoma de la célula hospedadora y se reproduce como material genético de la misma (profago). En el caso que las células hospe-

dadoras se encuentren en condiciones de estrés, la infección puede convertirse en lítica. La lisogenia parece ser la forma infectiva más frecuente en sistemas oligotróficos, debido a la menor abundancia bacteriana de estos sistemas, lo que disminuye la probabilidad de encuentro entre virus y la célula hospedadora, comparado con los eutróficos. Es una manera hábil de mantenerse amparado por la célula hospedadora hasta el momento propicio (estrés, incremento de la abundancia bacteriana) en que se convierten en líticos y salen al exterior a infectar nuevas células). Por tanto, la infección vírica de procariotas debe tenerse en cuenta en el funcionamiento del bucle microbiano. Los virus pueden catalizar la transformación de materia orgánica particulada (bacterias) en materia orgánica disuelta que proviene del contenido de los microorganismos hospedadores durante la lisis celular. La actuación de los virus favorecerá las cadenas tróficas dominadas por pequeños organismos con poca exportación y retención de nutrientes en la zona fótica. Paradójicamente, la presencia de virus a la vez que incrementará las tasas de mortalidad bacteriana, también favorecerá su producción y respiración, debido a los nuevos aportes de materia orgánica disuelta.

### Equipamiento necesario

- Bomba peristáltica.
- Portafiltros de 47 mm.

### Reactivos u otro material fungible

- Agua ultrapura.
- NaOH 0,5 N.
- Lejía.
- Etanol 5%.
- Mitomicina C.
- Pipetas.
- Puntas de pipeta,
- Tubos de plástico para el sistema de filtración.
- Tubos falcon, 50 ml.
- Guantes.
- Crioviales.

### Descripción de la técnica

El método utilizado para los experimentos es el descrito por Weinbauer et ál. (2002), conocido como método de reducción-dilución. En él se va a determinar la producción vírica debida a la lisis bacteriana de células infectadas con virus líticos, así como la lisis inducida por Mitomicina C de bacterias infectadas con virus lisogénicos. La lisis inducida en las muestras tra-

tadas con Mitomicina C nos da la producción total de virus (líticos más lisogénicos). A partir de aquí se puede calcular cuál es la concentración de virus lisogénicos: producción total de virus menos producción por lisis.

### *Protocolo del experimento de producción vírica*

#### a) Diseño experimental

- Preparación de la Mitomicina C: disolver el contenido de un vial de 2 mg de Mitomicina C con 1 ml de agua ultrapura filtrada por 0.2  $\mu\text{m}$ . Añadir este volumen a 19 ml de agua ultrapura igualmente filtrada. Alicuotar y conservar a -20 °C.
- Obtener 200 ml de agua de mar libre de virus (=ultrafiltrada), mediante filtración tangencial con una membrana de 30KDa (Ver protocolo de concentración de ADN vírico).
- Concentración de bacterias: filtrar 1 l de agua de mar por 0.8  $\mu\text{m}$  y seguidamente reducirlo a 100 ml de concentrado de bacterias, mediante filtración tangencial con una membrana de 0.2  $\mu\text{m}$  (Ver protocolo de concentración de ADN vírico).
- Mezclar los 100 ml de concentrado de bacterias con 200 ml de agua de mar libre de virus. La idea es tener la misma concentración inicial de bacterias que en la muestra natural, pero habiendo eliminado la mayor parte de los virus.
- Tomar 6 tubos de 50 ml y repartir a cada uno 50 ml de la mezcla preparada previamente. En tres de ellos añadir 0.5 ml de la solución de trabajo de Mitomicina C (concentración final 1  $\mu\text{g ml}^{-1}$ ), para obtener la producción de virus total (infección lítica y lisogénica).
- Al finalizar se procederá al lavado de los cartuchos de 0.2  $\mu\text{m}$  y 30 KDa, tal y como está descrito en el protocolo de ultrafiltración tangencial.

#### b) Muestreo de alícuotas

- Incubar los 6 tubos de 50 ml en la oscuridad a la temperatura in situ. Tomar muestras, por duplicado, para abundancia de virus y bacterias para citometría, cada 4 horas (0, 4, 8, 12 y finalmente 24h). (Ver protocolo de Abundancia de Virus por Citometría).

### **Cuadro sinóptico de la técnica**

1. Concentrado de bacterias
2. Agua libre de virus.
3. Mezclar ambas fracciones.
4. cada 4 horas el incremento de la producción de virus en muestras con y sin mitomicina.



Figura 1. Bombas peristálticas con cartuchos de VIVAFLOW de 0.2  $\mu\text{m}$  y 30 KDa.

### Cálculo de los resultados

Las tasas de producción de virus que a partir de ellas podremos estimar las tasas de lisis bacteriana se calcularán según está descrito en Boras et ál. (2009).

### Referencias

- BORAS, J. A, M. M. SALA, E. VÁZQUEZ-DOMÍNGUEZ, M. G. WEINBAUER, D. VAQUÉ. 2009. «Annual changes of bacterial mortality due to viruses and protists in an oligotrophic coastal environment (NW Mediterranean)». *Environ. Microbiol.* 11: 1181-1193.
- WEINBAUER, M. G., C. WINTER, M. G. HÖFLE. 2002. «Reconsidering transmission electron microscopy based estimates of viral infection of bacterio-plankton using conversion factors derived from natural communities». *Aquat. Microb. Ecol.* 27: 103-110.

# 6

## DISTRIBUCIÓN Y FUNCIÓN DEL ZOOPLANKTON EN EL OCÉANO

---





## Muestreo de microzooplancton profundo (> 2000 m)

González-Gordillo, J. I.; Sánchez, R.

*CACYTMAR, Universidad de Cádiz*

### Finalidad. Campo de aplicación

Metodología para obtener muestras microzooplancton (20 – 200  $\mu\text{m}$ ) profundo en una estación de muestreo determinada, para estudios cualitativos o cuantitativos.

Aunque el microzooplancton es muy abundante en aguas poco profundas de casi cualquier zona geográfica (ver Gifford y Caron, 2000) y no se necesita filtrar grandes volúmenes de agua para obtener una muestra representativa, no es así en aguas profundas (> 1000 m), donde probablemente pocos litros de agua pueden no ser suficientes para conseguir buenas estimas. Se hace pues necesaria la utilización de un muestreador que consiga filtrar un elevado volumen de agua por una malla de 20  $\mu\text{m}$ .

### Conceptos generales

El microzooplancton marino (20 – 200  $\mu\text{m}$ ) corresponde a un importante y numeroso grupo de organismos que incluyen tanto a protistas heterótrofos (principalmente ciliados y dinoflagelados) como a pequeños metazoos (generalmente larvas de invertebrados). La importancia ecológica de este grupo radica en que son importantes consumidores de bacterias y protistas autótrofos, constituyendo uno de los eslabones tróficos entre el bucle microbiano y la clásica red trófica de los metazoos. Así, para el estudio de los procesos de los que forman parte son necesarias estimas fiables de su abundancia y biomasa.

## Equipamiento necesario

Actualmente existen tres formas de obtener muestras de plancton de un intervalo de profundidad determinado: las redes de plancton con sistemas de apertura y cierre controlados, las botellas oceanográficas y sistemas de succión combinados con redes de plancton. Cada una de estas técnicas es elegida en base al tamaño de los organismos que desean estudiarse y su abundancia en el medio.

El uso de las redes de plancton está orientado al muestreo de organismos pertenecientes a las fracciones de tamaño superiores ( $> 200 \mu\text{m}$ ), para las cuales es necesario filtrar grandes volúmenes de agua para obtener muestras representativas. Para la recogida de muestras a determinadas profundidades, las redes más simples incluyen sistemas de apertura y cierre accionados mediante mensajeros. Sin embargo, con este tipo de sistema es difícil conocer con precisión la profundidad a la que se cierra la red, pues el cable que la remolca describe con frecuencia una línea curva durante la tracción, complicando los cálculos para estimar la profundidad real del equipo. Otras redes de plancton, como la *MultiPlankton Sampler* o la *Longhurst-Hardy Plankton Recorder*, utilizan sistemas automatizados para la apertura y cierre de las redes, incluyendo sensores de profundidad, con lo que se asegura la recogida de muestras de plancton a una profundidad concreta. Pero este tipo de equipos implica un diseño robusto, voluminoso y pesado de los equipos, que hacen que su manejo dependa del uso de una embarcación provista de plumas o pórticos ad hoc y de personal especializado en maniobras de cubierta.

Por otro lado, el muestreo de organismos pertenecientes a las fracciones de tamaño inferiores a las  $200 \mu\text{m}$  con redes de plancton es poco frecuente, pues los elevados tamaños de las aberturas de entrada de las redes y/o las velocidades de arrastre desarrolladas por las embarcaciones usadas provocan una rápida colmatación de las redes dando lugar a muestras inservibles. Sea cual fuere el caso, la propia metodología de muestreo implica que la red deba llevarse hasta la profundidad de muestreo y posteriormente subirla a bordo. Cuando la profundidad de estudio es elevada, superior a los 1000 m, los tiempos de largado y virado de las redes de plancton pueden abarcar varias horas, mientras que el tiempo verdaderamente efectivo de toma de muestras implica escasos minutos.

En consecuencia, las redes de plancton existentes actualmente no son viables para la recogida de organismos planctónicos pertenecientes a las fracciones pequeñas ( $< 200 \mu\text{m}$ ) a altas profundidades, pues su manejo supone un elevado coste en términos de infraestructura material, humana y tiempos de ejecución.

Una alternativa al uso de las redes de plancton podría ser la utilización de botellas oceanográficas tipo Niskin. El uso de estas botellas, cuando van encastradas en rosetas oceanográficas, reducen a cero los tiempos de ma-

niobra y el personal adicional implicado, pues las muestras dirigidas a estudios planctónicos se recogen al mismo tiempo que se realizan otras tareas como perfiles para mediciones de variables físico-químicas y recogida de muestras de agua para medida de otras variables biológicas. No obstante, llevando a cabo este tipo de muestreo, el volumen de agua filtrada podría ser insuficiente, principalmente porque las botellas oceanográficas generalmente usadas tienen una capacidad de 12 l. Este problema se acentúa cuando se muestrea en zonas oligotróficas en donde se requiere un mayor volumen de muestreo. Así, las muestras obtenidas por estos métodos pueden no ser representativas debido al escaso volumen filtrado.

Por último, existen mecanismos que combinan un sistema de succión de agua y redes de plancton que filtran ese volumen de agua impulsado. Este ingenio asegura el filtrado de un volumen de agua suficiente para que la muestra sea representativa de la comunidad planctónica a estudio y, además, al trabajar de forma estacionaria, se puede precisar la profundidad de muestreo. Un sistema de apertura y cierre mecánico accionado por mensajeros podría impedir la contaminación de las muestras por organismos de otras profundidades. El principal problema es que muestreos a profundidades mayores a una centena de metros sería casi inviable pues sería necesaria la utilización de mangueras de succión enormemente largas.

Debido, por tanto, a la falta de un muestreador adecuado para el muestreo de microzooplancton profundo se ha diseñado para tal fin en el seno del Proyecto Malaspina un equipo denominado *Bottle-net* y que mejora las características de los citados anteriormente en volumen muestreado, consumo de tiempo, coste y dificultad de manejo (información más completa en [www.sondara.com](http://www.sondara.com)).

La *Bottle-net* (Figura 1) está optimizada para trabajar acoplado a una roseta de botellas oceanográficas, pero podría utilizarse también de forma autónoma si es fijado a un cable oceanográfico lastrado. El funcionamiento general del equipo se basa en la canalización y filtrado de un determinado volumen de agua mediante una pequeña red de plancton de 20  $\mu\text{m}$  de luz de malla insertada dentro de una estructura rígida (carcasa), provista a su vez de un colector terminal. Los mismos disparadores remotos que se utilizan para cerrar las botellas de agua se utilizan para cerrar este sistema a una profundidad determinada. Durante su utilización, el agua a muestrear entra por una abertura superior, atraviesa la red de plancton de un micraje específico y sale a través de unas ventanas y orificios de evacuación. Los organismos quedan retenidos por la red y van acumulándose en el colector terminal del que se extraen posteriormente.

Al tratarse de un procedimiento carente de automatismos, debe establecerse un flujo de agua constante que asegure la entrada de los organismos dentro de la red. Este flujo se consigue gracias al desplazamiento vertical del equipo (de abajo a arriba) a lo largo de la columna de agua. En el caso de utilizarse montado en una roseta oceanográfica es ésta la que al recorrer

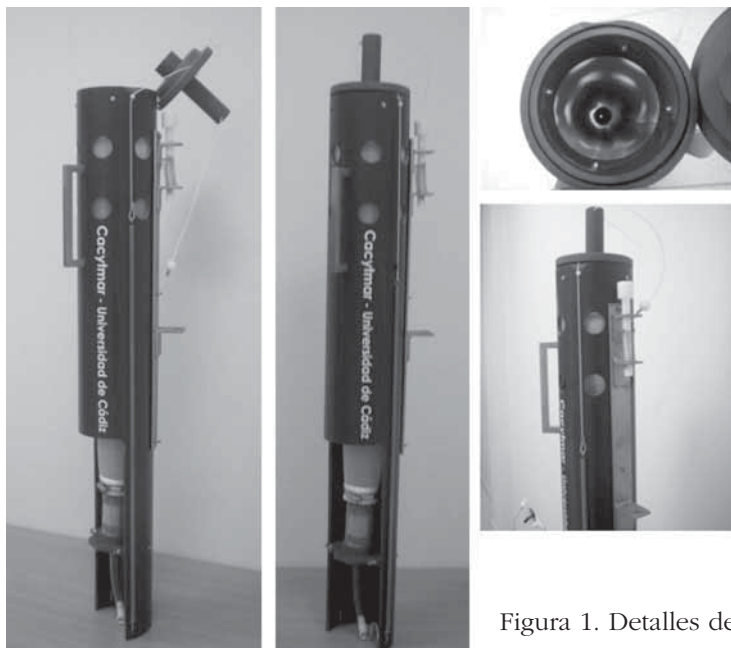


Figura 1. Detalles de la *Bottle-net*.

un trayecto vertical durante su utilización asegura la entrada de agua en el aparato, entre unos límites de profundidad establecidos por el investigador.

En el caso de disponer de dos disparadores libres en la roseta oceanográfica, existe una versión de la *Bottle-net* que puede abrir la tapa de entrada y cerrarla utilizando ambos disparadores, ello permitiría el muestreo de un estrato de la columna de agua desde cualquier profundidad y no necesariamente desde la profundidad máxima del perfil, como sucedería con la versión de un solo disparador.

## Descripción de la técnica

### *Toma de muestras*

Las muestras son el resultado de la filtración de la columna de agua que entra por la boca de la botella, desde la máxima profundidad a la que baje la roseta hasta la profundidad de cierre (ésta siempre por encima de la profundidad máxima alcanzada).

Inicialmente la *Bottle-net* desciende abierta, gracias a uno de los cables tensores de la roseta oceanográfica que mantiene abierta la tapa superior de la botella. Al llegar a la profundidad máxima del perfil la roseta oceanográfica comienza el ascenso y, como consecuencia, comienza a entrar agua en la *Bottle-net* que va siendo filtrada. Al llegar a la profundidad superior de

muestreo elegida, la entrada de agua hacia la red es interrumpida mediante el cierre de la abertura superior por la tapa hermética. Este cierre se consigue mediante la liberación de un cable tensor que une la tapa superior de la *Bottle-net* y uno de los disparadores automáticos del mecanismo de cierre remoto que utiliza la roseta oceanográfica para cerrar las diferentes botellas de muestreo. En este momento, unos muelles colocados en la tapa superior del sistema actúan cerrando la carcasa. Así, la entrada de agua al equipo queda sellada, impidiéndose la entrada de agua y, por tanto, evitándose la contaminación de la muestra por otros organismos de capas superiores. Por último, la muestra es recogida de un colector situado en el extremo inferior de la botella donde se acumulan los organismos filtrados (Figura 2).

Durante el uso de este equipo debe tenerse en cuenta las siguientes recomendaciones:

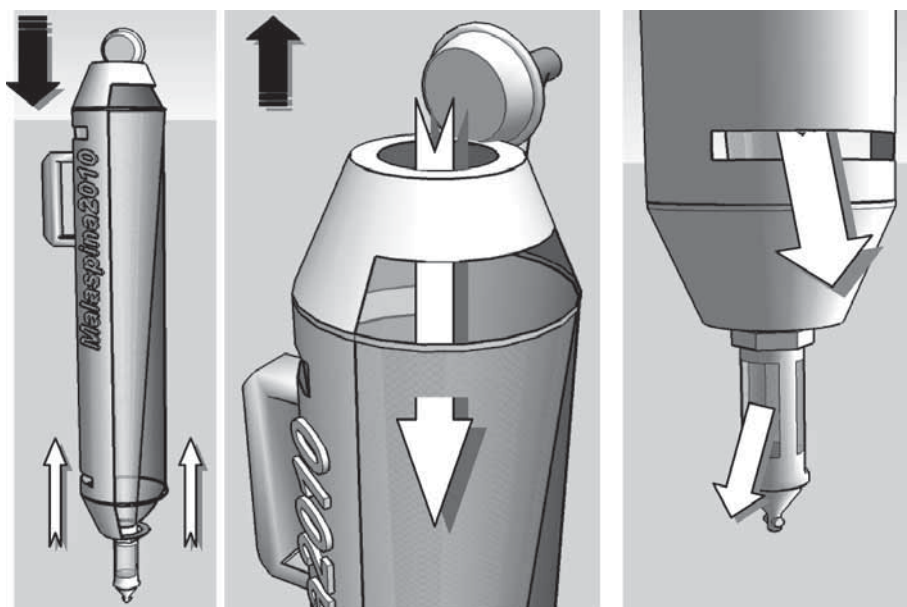


Figura 2. Esquema del funcionamiento de muestreador se indica a continuación. Las flechas negras indican el sentido de movimiento del equipo; las flechas blancas indican el sentido de movimiento del agua.

- Antes del inicio del muestreo debe llenarse hasta rebosar el colector de la *Bottle-net* con agua filtrada por malla inferior a  $1\ \mu\text{m}$ . Esto evita que los posibles organismos de superficie que puedan entrar al introducir el equipo en el agua se depositen en el fondo del colector y no puedan ser lavados durante la bajada de la roseta. En el caso de la versión de dos disparadores esta recomendación no sería necesaria.

- La roseta oceanográfica que porta la *Bottle-net* no debe pararse ni durante el descenso ni durante el ascenso, hasta que se llega a la profundidad de cierre de la *Bottle-net*, es decir, la roseta debe descender de forma continua hasta la profundidad máxima del perfil y seguidamente iniciar la subida también sin paradas. Si sucedieran paradas durante la bajada podría entrar agua de estratos superiores y contaminar la muestra. Si las paradas sucedieran durante el ascenso las redes podrían perder parte de la muestra por lavado.
- Antes de cualquier muestreo deberían hacerse pruebas para tener noción de la densidad de organismos existente en el estrato a muestrear. Un filtrado de gran cantidad de agua en un estrato de alta densidad de organismos supondrá la rápida colmatación de la red y la inutilidad de la muestra.
- Para la extracción de la muestra se recomienda no lavar la red con agua a presión pues seguramente esto provocaría la rotura de numerosos organismos de gran fragilidad. Debido a esto solo se recogerán los organismos que fluyan fácilmente a través del tapón del colector.
- Tras el muestreo, la red debe lavarse concienzudamente con agua filtrada tras cada muestreo, recomendándose sumergirla en lejía diluida cada 4 muestreos, con la idea de eliminar restos orgánicos que pudieran atascar la malla.

### *Conservación de muestras*

Dependiendo de la finalidad de las muestras el tratamiento de estas se realizará de distinta forma. No obstante, debe considerarse que los organismos del microzooplankton son muy frágiles y pueden romperse con facilidad, lo que dificultaría su estudio. A continuación se detalla el método de conservación para muestras que serán procesadas para análisis metagenómico y muestras para fines taxonómicos.

**Muestra para metagenómica:** para la recogida de la muestra se extrae el tapón del colector y el contenido se vierte directamente en un sistema kitsato-vaso de filtración provisto de un filtro GF/F. Si la filtración es muy lenta se le puede aplicar ayudar succionando de forma muy suave con un pipeteador o bomba de mano. Los organismos quedarán retenidos en el filtro de fibra de vidrio. No utilizar una bomba de vacío pues podrían romperse los organismos y perderse su ADN. Posteriormente se extrae el filtro y se coloca enrollado en un tubo de plástico de polipropileno de 5ml al que se le añade etanol absoluto hasta cubrirlo totalmente. Durante todo el proceso debe tenerse especial cuidado de no contaminar la muestra con ADN extraño (restos de otros organismos, etc.). Se recomienda sellar el tubo con parafilm.

**Muestras para Taxonomía:** la mayoría de los organismos capturados serán ciliados por lo que se recomienda utilizar lugol para su conservación.

Preparar un frasco de vidrio color topacio de volumen adecuado con Lugol ya añadido; la concentración final de la muestra debe tener un contenido mínimo de lugol del 2%. Verter el contenido del colector de la *Bottle-net* directamente al frasco topacio, añadiéndosele, en caso necesario, agua de mar filtrada ( $< 5 \mu\text{m}$ ). No limpiar la red ni el colector con pulverizadores, para evitar al máximo la rotura de organismos.

El lugol es una solución que se degrada rápidamente con la luz, por tanto debe guardarse en oscuridad y en un envase de color topacio. También los frascos deben ser de vidrio pues el lugol se adhiere a las paredes plásticas disminuyendo su concentración en la solución conservante.

### *Estadillo de datos*

Se recomienda un modelo de estadillo que contenga los siguientes campos:

Volumen *Bottle-net*, N° cast roseta, Hora inicio roseta, Hora fin roseta, Prof max Perfil, Hora inicio filtrado, Prof. Inicio Filtrado, Hora fin filtrado, Prof. Fin filtrado, Prof DCM, Prof. del Min. O<sub>2</sub>, Prof DSL, Temperatura, Salinidad, Observaciones del muestreo.

### *Etiquetado*

No escribir directamente sobre el frasco, se borra con los conservantes o por el propio manejo. Etiquetar siempre sobre etiquetas adhesivas. Cada etiqueta debe ser cubierta por cinta de precinto transparente suficientemente ancha como para cubrir sobradamente la etiqueta. Verificar los datos de la etiqueta con los datos del muestreo y estadillo.

### **Calibración**

Debe evitarse que sucedan casos de colmatación de la red o de retroceso del agua a filtrar, debidos a una elevada abundancia de organismos filtrados o a una rápida velocidad de izado de la botella oceanográfica. Ambas circunstancias podrían evitarse realizando muestreos preliminares. Durante el muestreo la roseta no debe pararse pues podrían salirse los organismos capturados, el muestreo debe realizarse sin pausas.

### **Cálculo de resultados**

El cálculo del volumen de agua filtrada se estima resolviendo la siguiente ecuación:

$$Vol = (h_i - h_f) \times \pi r^2$$

siendo la profundidad de inicio del muestreo (máxima profundidad alcanzada), la profundidad final (profundidad de cierre de la red) y el radio de la abertura de entrada.

### Control de calidad

Aunque organismos superiores a 200  $\mu\text{m}$  pueden ser recogidos mediante esta técnica, estos no deberían usarse para estudios cuantitativos, pues su número podría estar subestimado debido al pequeño diámetro de boca de entrada del muestreador y a la alta capacidad de evasión de los organismos superiores a este tamaño.

### Referencias

GIFFORD, D. J.; D. A. CARON. 2000. «Sampling, preservation, enumeration and biomass of marine protozooplankton, Cap. 5: 193-221». En: HARRIS, R. P.; WIEBE, P. H.; LENZ, J.; SKJOLDAL, H. R.; HUNTLEY, M. (eds.). *ICES Zooplankton Methodology Manual*. Academic Press, 684 pp.



# Muestreo de microplancton superficial

González-Gordillo, J. I.; Sánchez, R.

*CACYTMAR, Universidad de Cádiz*

## Finalidad. Campo de aplicación

Metodología para obtener muestras de microplancton superficial (3-5 m) a partir de grandes volúmenes de agua, durante la travesía entre puntos de muestreo o en un punto fijo, con la idea de advertir cambios en la distribución, composición taxonómica, biomasa, etc. El rango de tamaño muestreado será de 20 a 200  $\mu\text{m}$ , aprovechándose la bomba continua del termosalinómetro instalado en el barco.

## Conceptos generales

El microplancton agrupa a una alta diversidad de organismos marinos de naturaleza muy heterogénea, encontrándose entre ellos a diatomeas, dinoflagelados, protozoos, nauplios de copépodos, etc. En aguas superficiales constituyen una importante fuente de carbono orgánico que es aprovechado, en gran parte, por organismos planctónicos que migran diariamente desde aguas más profundas para alimentarse.

## Equipamiento necesario

Termosalinómetro trabajando en continuo con caudal constante.

## Descripción de la técnica

### *Toma de muestras*

Las muestras se toman a partir del grifo de salida del termosalinómetro continuo instalado en el barco. El grifo se mantendrá abierto siempre y en la misma posición, con la idea de mantener un caudal constante durante el muestreo. Este caudal se calibrará antes y después de cada muestreo cronometrando el tiempo de llenado de un cubo aforado.

El agua saliente del grifo se hará pasar por un juego de tamices de 200 y 20  $\mu\text{m}$  colocados uno encima del otro. La muestra que se recogerá será la retenida en el tamiz de 20  $\mu\text{m}$ . El tamiz de 200  $\mu\text{m}$  actuará para descartar organismos mayores a esta fracción.

Debido a que la distribución de este grupo organismos está muy condicionada por la intensidad de la luz se recomienda que se tomen 2 muestras diarias en el mismo punto de muestreo, una en cada fase del día (día y noche). El tiempo de muestreo, dependiendo del tipo de aguas, está en torno a una hora. Las muestras se tomarán intentando hacerlas coincidir con la mitad del día (12:00) y mitad de la noche (00:00), respectivamente. Debe tenerse en cuenta que estas horas corresponden a hora solar y no a hora local u hora UTC, y que habitualmente son las usadas en los barcos.

### *Conservación de muestras*

Las muestras deberán fijarse rápidamente para evitar la degradación de los organismos.

El material colectado en el tamiz de 200  $\mu\text{m}$  se desecha pues estará subestimado debido a que no todos los organismos superiores a este tamaño tienen la misma probabilidad de entrar por el tubo de captación del termosalinómetro. Los organismos retenidos en el tamiz de 20  $\mu\text{m}$  se concentran con ayuda de un frasco lavador y muy suavemente, para evitar la rotura de los organismos frágiles como ciliados, se vierte la muestra en una jarra graduada de 1 l.

Para hacer una mejor conservación de la mayoría de los organismos capturados conviene dividir la muestra y fijarla con distintos conservantes. Para ello se añade agua de mar filtrada ( $< 5 \mu\text{m}$ ) a la jarra que contiene la muestra hasta enrasar a 200 ml. Mediante el uso de una segunda jarra se transvasa la mezcla suavemente varias veces, de una a otra, de forma que todos los organismos se repartan de la forma más aleatoria posible. Tras esto la muestra se divide en dos mitades iguales de 100 ml. Una mitad se pasa a un frasco de 125 ml de plástico y se le añaden 10 ml de Formaldehído filtrado al 40% saturado con Bórax, para llegar a la proporción del 4% de conservante. Un sistema rápido y seguro para medir el volumen de fijador es utilizar una jeringuilla de boca ancha de unos 30 ml provista de un filtro desechable. La segunda mitad de la muestra se vierte en un frasco de

vidrio color topacio de 125 ml, al que se le ha añadido previamente 2 ml de lugol, quedando la muestra con una concentración final de conservante mínima del 2%. Posteriormente, el frasco se enrasa con agua de mar filtrada sin que llegue a rebosar. De esta forma se intenta que el frasco contenga la menor cantidad de aire posible el cual termina degradando el lugol.

### *Estadillo de datos*

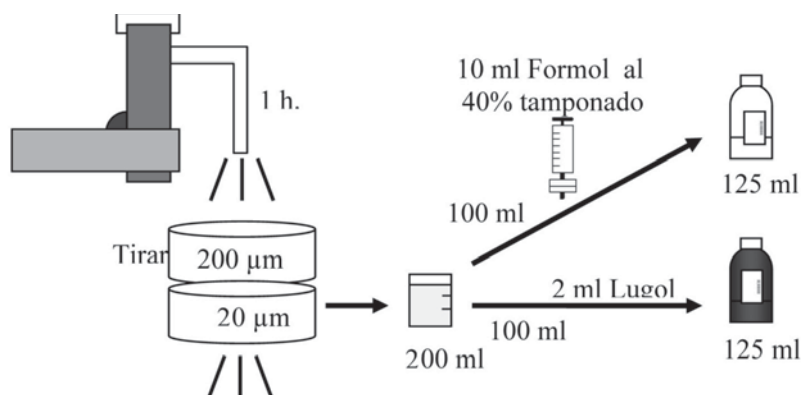
Se recomienda un modelo de estadillo que contenga los siguientes campos:

Fase del Día, Calibración Caudal (l/min), Hora inicio (UTC), Latitud inicio, Longitud inicio, Estado cielo, Hora fin (UTC), Latitud final, Longitud final, Tiempo filtrado (min), Vol. Filtrado (m<sup>3</sup>), Observaciones.

### *Etiquetado*

No escribir directamente sobre el frasco, se borra con los conservantes o por el propio manejo. Etiquetar siempre sobre etiquetas adhesivas. Cada etiqueta debe ser cubierta por cinta de precinto transparente suficiente-mente ancha como para cubrir sobradamente la etiqueta. Verificar los datos de la etiqueta con los datos del muestreo y estadillo.

### Cuadro sinóptico de la técnica



### Reactivos y material de laboratorio

#### Conservantes:

- Formaldehído al 4% tamponado con Bórax.
- Lugol acético.

**Material de laboratorio:**

- Frascos de 125 ml para muestras de plástico y vidrio color topacio.
- Jarras graduadas 1 l.
- Jeringuilla de 12 ml.
- Jeringuilla de 60 ml.
- Filtros desechables y portafiltro para jeringuilla.
- Juego de colectores de 20 y 200 micras.
- Cronómetro.
- Cubo de 5 a 8 l aforado.
- Material de etiquetado.
- Estadillo.

**Calibración**

El caudal del continuo debe ser calibrado antes y después de cada muestra mediante el llenado de un cubo aforado. El dato se obtiene midiendo el tiempo que tarda en llenarse el recipiente aforado. Realizar varias réplicas para obtener una mejor estima. Pasar los datos a l/min y anotar en el estadillo.

**Control de calidad**

Es importante asegurarse que no existe ningún tipo de filtro en los conductos del termosalinómetro que puedan impedir la entrada del plancton.

Deberá controlarse el funcionamiento del sistema mientras que las primeras muestras se estén tomando, ajustando la apertura del grifo a la cantidad de plancton que se recoge con la idea de que no se colmaten los tamices.

Este tipo de muestreo no debería utilizarse para el estudio cuantitativo de organismos mayores de 200 micras pues los valores de abundancia estarían subestimados.

**Otras técnicas similares**

Otro método de recogida de microplancton implica el uso de botellas oceanográficas montadas en rosetas, pero esta técnica requiere que el barco este parado y que se reserve una botella para estas muestras. Mediante esta técnica no es necesario reservar botellas solo para este fin y el barco puede seguir navegando.

# Procesado de muestras de plancton para el análisis de isótopos estables

Bode, A.; Fernández Lamas, A.; Mompeán, C.  
*C.O. A Coruña. Instituto Español de Oceanografía*

## Finalidad. Campo de aplicación

Obtener una distribución del contenido en isótopos estables de C y N, según clases de tamaño, especies o grupos taxonómicos característicos del plancton.

## Conceptos generales

La medida de la abundancia natural de isótopos estables permite hacer inferencias sobre el origen de la materia orgánica y nutrientes inorgánicos en los organismos y redes tróficas (Lajtha y Michener, 1994). El proceso por el cual los isótopos más ligeros reaccionan de forma preferente en las reacciones químicas (fraccionamiento isotópico) causa que los productos de la reacción contengan una mayor proporción de isótopos ligeros (enriquecimiento isotópico) a la vez que las sustancias que reaccionan incrementan su proporción de isótopos pesados. El conocimiento de los valores de abundancia natural de isótopos en las distintas fuentes de materia orgánica y nutrientes (terrestres, marinas, antropogénicas, etc.) en las que han ocurrido procesos diferentes de transformación es clave para distinguir la contribución de nutrientes de cada fuente a un tipo de organismo. Además, el fraccionamiento isotópico también causa que exista un enriquecimiento en los isótopos pesados entre las presas y sus consumidores, especialmente en el caso del nitrógeno (Vander Zanden y Rasmussen, 2001). Esta característica facilita la cuantificación de los niveles tróficos y los estudios de estructura en las redes tróficas en el plancton (ej. Bode y Alvarez-Ossorio, 2004; Bode et ál. 2007).

## Equipamiento necesario

Estufa de secado (mejor con aire forzado, regulable a 60 °C).

Sistema de filtración a vacío (bomba, rampa multipuesto, soportes y embudos para filtros de 47 mm de diámetro, kitasato o depósito para el agua).

## Reactivos u otro material fungible

### Reactivos:

- Agua de mar filtrada (al menos por 40  $\mu\text{m}$ ).
- Agua desionizada ultrapura Milli-Q o similar (DDW).
- Ácido clorhídrico (para preparar diluciones con DDW al 5%).
- Gel de sílice con indicador (Silicagel).

### Material:

- Tamices plásticos (jarras) de malla de 40, 200, 500, 1000 y 2000  $\mu\text{m}$ .
- Embudos de plástico de boca ancha (capacidad 500-1000 ml).
- Nevera de plástico (para llenar de agua de mar filtrada y lavar los tamices).
- Jarra plástico de 2 l graduada.
- Pulverizador (de jardinería).
- Probetas de plástico (250, 1000 ml).
- Pinzas para filtros.
- Frascos lavadores.
- Filtros de fibra de vidrio (GFF; ej. Whatman GF/F). Cada filtro estará prepesado ( $\pm 0.002$  mg) y guardado en cajas de Petri de plástico con el peso anotado en la tapa de cada placa.
- Placas Petri de plástico (con los filtros).
- Recipientes de plástico herméticos (tipo *Tupperware*).
- Papel de filtro de laboratorio (para hacer bolsitas en las que se mete Silicagel).
- Botes de plástico de 60 ml tapón de estrella.
- Guantes de látex o vinilo (sin talco).
- Cinta adhesiva (para cerrar las placas).
- Material de etiquetado.
- Estadillo.

## Calibración

Para el muestreo no hace falta ninguna referencia ni calibración. Para el análisis posterior por espectrometría de masas se emplea como referencia la composición isotópica del  $\text{N}_2$  atmosférico (Lajtha y Michener, 1994). Para interpretación de los resultados hace falta una referencia del ecosistema estudiado (idealmente el fitoplancton o en su defecto la materia orgánica particulada).

## Descripción de la técnica

Las muestras a procesar se obtuvieron de las pescas de microzooplankton realizadas con la red de 40  $\mu\text{m}$  y de mesozooplankton realizadas con una red Multinet Maxi-Hidrobios (300  $\mu\text{m}$ ) o con redes tipo WP2 (200  $\mu\text{m}$ ).

### *Procesado de muestras de microplankton, red de 40 $\mu\text{m}$*

La muestra obtenida mediante la red de plancton se pasa a un vaso de precipitados y se enrasa a los 250 ml. De ellos, 50 ml se fijan con formol 4% tamponado con bórax en un bote de 60 ml de tapón estrella. El resto se fracciona por tamaños en la columna de tamices: 200 y 40  $\mu\text{m}$ .

El proceso se realiza manteniendo la columna de tamices semisumergidos en agua de mar filtrada, moviendo suavemente uno a uno los tamices para repartir la muestra en el tamiz correspondiente al tamaño de cada partícula.

El contenido del tamiz de 40  $\mu\text{m}$  se recoge lavándolo sobre una jarra hasta enrasarla a 250 ml y a continuación se filtra por un filtro GF/F de 47 mm prepesado.

IMPORTANTE: el tamiz y la jarra se lavan cuidadosamente con agua de mar filtrada a fin de colectar todo el material. El volumen de agua utilizado en este lavado no influye en los cálculos posteriores de abundancia o biomasa.

En los casos en que el material recogido fuera muy abundante y pudiera saturar el filtro, por lo que no se podrían filtrar los 250 ml enrasados, se anota el volumen filtrado finalmente en el estadillo.

El filtro GF/F con la muestra se guarda en una caja Petri, anotando los datos correspondientes al número de filtro (correlativo), peso seco del filtro y etiqueta de la placa en el estadillo.

El filtro con muestra se seca en su placa (abierta) en estufa (60 °C, 48 h) y después se guarda, cerrando la placa cerrada con cinta adhesiva, en una caja hermética (tipo Tupperware) con bolsitas de papel de filtro con Silicagel.

### *Procesado de las muestras de la red de mesoplankton (Multinet, WP2)*

Tras la recogida de la muestra, la parte correspondiente al estudio de isótopos se enrasa a 250 ml. De este volumen se retiran 50 ml, después de homogeneizar el contenido, y se fijan con formol al 4% en un bote de tapón de estrella de 60 ml.

El resto de la muestra se fracciona como se ha descrito para el microzooplankton, con una columna de tamices de 2000, 1000, 500 y 200  $\mu\text{m}$ . Cada una de las fracciones retenidas en los tamices se enrasó a 250 ml y se filtra por filtros GF/F prepesados. Como en el caso de microzooplankton, si no es posible filtrar todo el material recogido se anota el volumen filtrado en el estadillo. El filtro GF/F con la muestra se guarda en una caja Petri, anotando los datos correspondientes al número de filtro (correlativo), peso

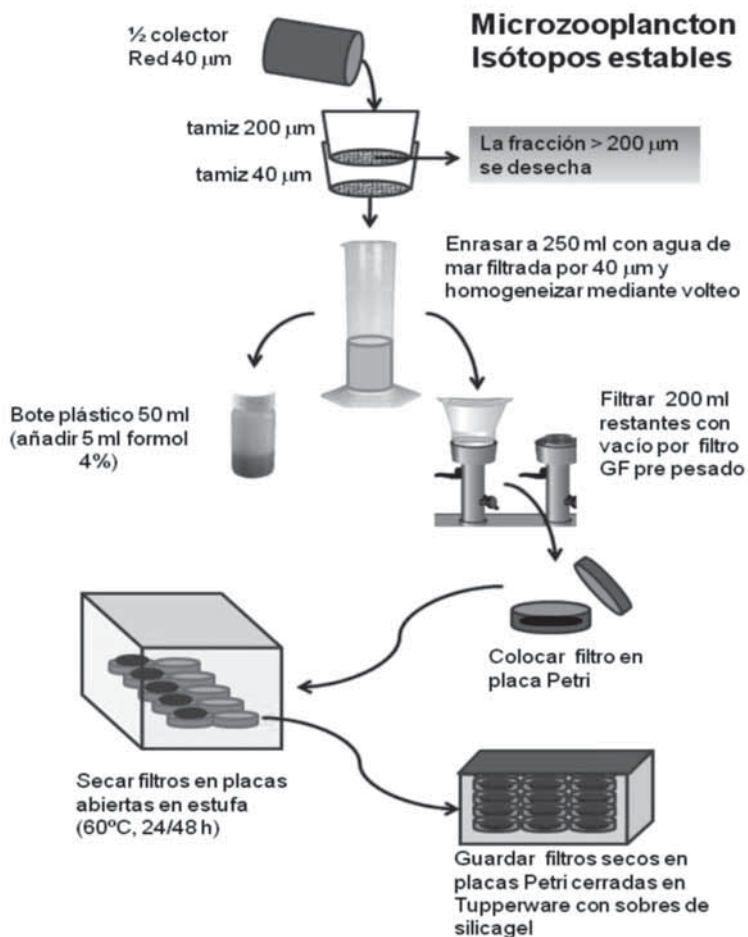
seco del filtro y etiqueta de la placa en el estadillo. El filtro con muestra se seca en su placa (abierta) en estufa (60 °C, 48 h) y después se guarda, cerrando la placa cerrada con cinta adhesiva, en una caja hermética (tipo *Tupperware*) con bolsitas de papel de filtro con Silicagel

### *Estadillo de datos*

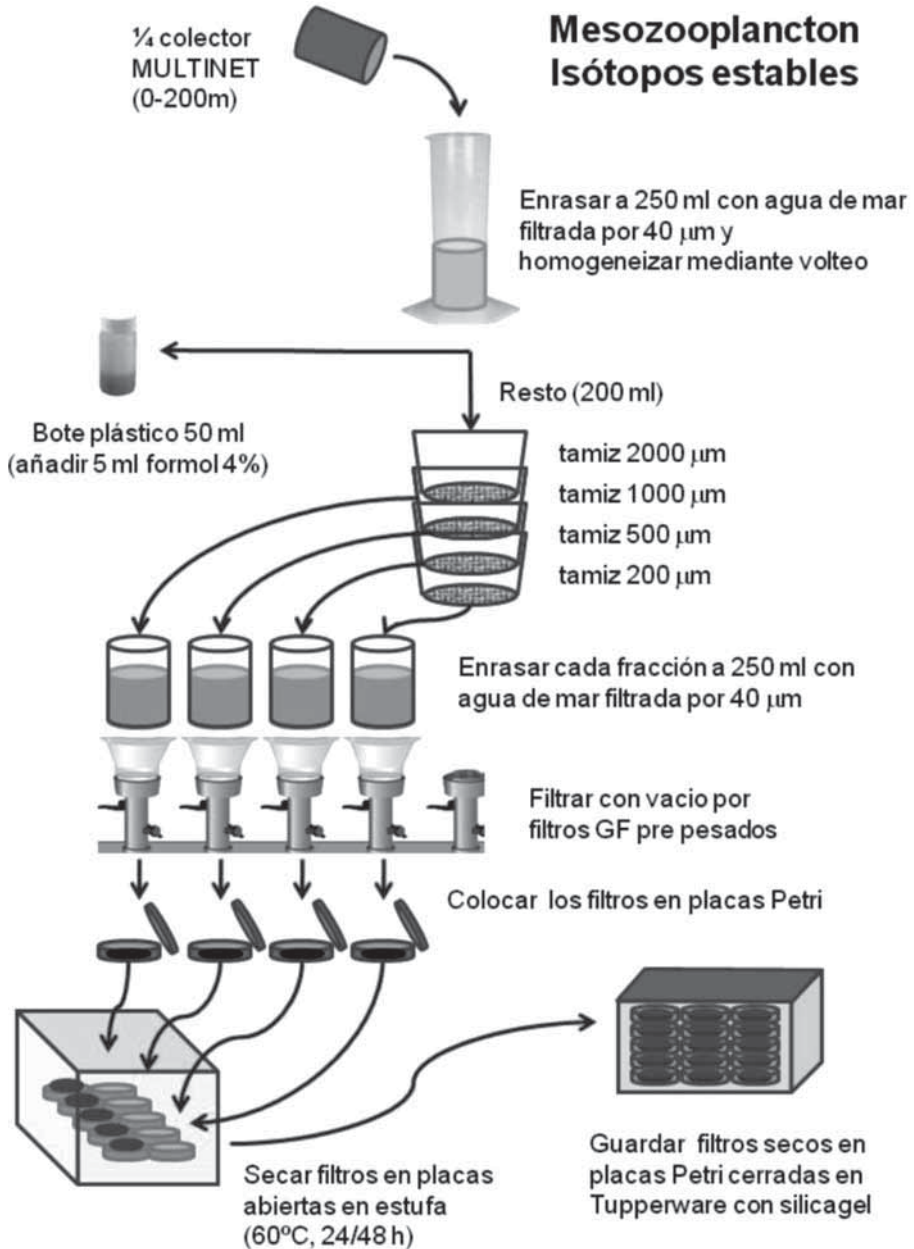
Se recomienda un modelo de estadillo que contenga los siguientes campos:

Latitud, Longitud, Hora inicio, Hora fin, Columna muestreada, Observaciones, Código muestra, Volumen filtrado, Volumen alícuota, N° filtro, Peso filtro.

### Cuadro sinóptico de la técnica







## Control de calidad

No hay controles de calidad específicos para este muestreo. Se mantuvo una limpieza escrupulosa de las redes en su uso y almacenamiento. Se usaron guantes al manipular las muestras y se trabajó en un lugar limpio. Todo el material (tamices, copas de filtración, embudos) se lavó al finalizar las operaciones diarias con agua acidulada (agua destilada Milli-Q con HCl al 5%, aproximadamente).

## Otras técnicas similares

La alternativa al secado de plancton, paso previo necesario para después aplicar la espectrometría de masas, es la liofilización que se suele aplicar a organismos de mayor tamaño (Bode et ál. 2007).

## Referencias

- BODE, A, M. T. ALVAREZ-OSSORIO. 2004. «Taxonomic versus trophic structure of mesozooplankton: a seasonal study of species succession and stable carbon and nitrogen isotopes in a coastal upwelling ecosystem». *ICES J. Mar. Sci.* 61: 563-571.
- BODE, A., M. T. ALVAREZ-OSSORIO, M. E. CUNHA, S. GARRIDO, J. B. PELETEIRO, C. PORTEIRO, L. VALDÉS, M. VARELA. 2007. «Stable nitrogen isotope studies of the pelagic food web on the Atlantic shelf of the Iberian Peninsula». *Prog. Oceanogr.* 74: 115-131.
- HARRIS R. P., P. WIEBE, J. LENZ, H. R. SKOJDAL, M. HUNTLEY. 2000. «ICES Zooplankton methodology manual». Academic Press, San Diego.
- LAJTHA, K., R. H. MICHENER. 1994. «Stable isotopes in ecology and environmental science». Vol. *Blackwell Scientific Publications*, Oxford.
- VANDER ZANDEN, M. J., J. B. RASMUSSEN. 2001. «Variation in d15N and d13C trophic fractionation: Implications for aquatic food web studies». *Limnol. Oceanogr.* 46: 2061-2062.

# Procesado de muestras de zooplancton gelatinoso para taxonomía, barcoding y análisis del contenido en carbono

Acuña, J. L.; Molina-Ramírez, A.

*Universidad de Oviedo*

## Finalidad. Campo de aplicación

Tratamiento de muestras de zooplancton gelatinoso destinadas a análisis filogenéticos de código de barras de ADN (*barcoding*), fotografía digital para identificación taxonómica, peso fresco y contenido de carbono.

## Conceptos generales

Excepto en el caso de especialistas que tienen un interés particular en el estudio del plancton gelatinoso, este tipo de organismos raramente se muestrea en el mar. En general, son animales frágiles y que, cuando aparecen, lo hacen en densos enjambres que obturan las redes de pesca. Esto suele ser interpretado como un problema más que como una oportunidad, y en no pocas ocasiones el material gelatinoso es despreciado. Esta práctica, aunque humanamente comprensible, no se compadece con la importancia ecológica y socioeconómica de estos organismos, que median importantes flujos de materia y energía, obturan redes de pesca, cierran playas turísticas (Richardson et ál. 2009), compiten con los peces (Purcell y Strudevant, 2001), etc.

En aguas costeras y oceánicas se muestrean una gran diversidad de ambientes, por lo que es grande la probabilidad de encontrarse con zooplancton gelatinoso, contemplándose la posibilidad de que muchos de esos organismos sean nuevos para la ciencia. Es preciso disponer de un protocolo adaptativo para responder a esas situaciones, permitiendo el muestreo de

una serie de parámetros básicos sobre la biodiversidad y ecología de estos organismos. Al mismo tiempo, ese protocolo debe ser sencillo y aplicable por no especialistas.

### Equipamiento necesario

- Redes de plancton.
- Congelador -80 °C.
- Estufa a 60 °C.
- Cámara DSLR (canon Mark III).
- Objetivo macro 100 mm.
- Mesa de reprografía Kaiser Re PRO con columna.
- Juego de Flashes de Estudio de 600 W.
- Brazos articulados para flashes.
- Placa-stand de policarbonato.
- Ordenador Macintosh IMAC 21.5 pulgadas (para el control remoto de la cámara).
- Disco RAID 4TB.
- *Software* de manejo remoto de la cámara y de administración de archivos fotográficos.
- *Software* de respaldo automático de información.
- Cables USB.
- Cable Syncro.
- Supresor de picos de energía eléctrica.

### Reactivos u otro material fungible

#### Reactivos:

- Agua de mar filtrada.
- Silicagel para muestras secas de CNH.
- Etanol Absoluto 96%.
- Formol al 4%.
- Cristales de mentol o benzocaina.

#### Otro material:

- Baño para mantener muestras frescas.
- Jarra de filtración con tamiz de 5 mm.
- Placas Petri de vidrio de diferentes diámetros.
- Escalas para referencia espacial en las fotografías.
- Frascos lavadores.
- Lámpara de alcohol o mechero bunsen.
- Pinzas.
- Coladores de distintos tamaños.

- Red de NYTAL.
- Bandejas de aluminio de diferentes tamaños.
- Botes plásticos con sistema de cierre hermético (volúmenes: 180, 280, 500, 800 ml).
- Dispensador de volumen fijo para formol y para etanol absoluto.
- Papel para etiquetas de muestras de sistemática.
- Marcadores indelebles.
- Tubos de centrifuga de polipropileno de 15 ml (muestras de *barcode*).
- Pesos de referencia para calibración.

## Calibración

En el proceso de determinación de peso húmedo se requiere utilizar pesas de referencia para calibrar la balanza. En el proceso de obtención de imágenes digitales se requiere calibrar el tipo de iluminación en función de un patrón general de los diferentes grupos de zooplankton gelatinoso. Este proceso previo permite que la obtención de imágenes implique que la interacción del operario con la muestra se limite al encendido y apagado del equipo y al enfoque del organismo teniendo como referencia un cuadro de los caracteres taxonómicos relevantes para diferentes grupos de zooplankton gelatinoso (ver técnica de fotografía de zooplankton gelatinoso y cuadro de caracteres). Para que las imágenes puedan ser utilizadas posteriormente en análisis morfométricos estas deben tener siempre una referencia de tamaño. Estas referencias deben ser durante todo el muestreo iguales y conservarse para posteriores comprobaciones y ajustes.

## Descripción de la técnica

A continuación presentamos una serie de apartados que contiene el flujo de operaciones requeridas durante el muestreo, que incluye decisiones, saltos entre secciones y repeticiones de procesos o bucles. Las secciones son presentadas con la estructura de código de programación y dependiendo de la situación se vuelve o se dirige a puntos específicos del proceso. Se describen también los procesos de etiquetado y preparación del equipo fotográfico.

Esta ficha contiene un guión orientado a cubrir los siguientes aspectos:

- 1) La identificación taxonómica a partir de ejemplares fijados.
- 2) La obtención de una marca genética (*barcoding*) que permita registrar la biodiversidad incluso en el caso de que no se disponga de una identificación taxonómica, o que permita desarrollar un marca-

dor molecular para diferenciar genéticamente las poblaciones de las especies de amplia distribución.

- 3) La medición del contenido en carbono y del peso fresco, con el objeto de poder hacer estimas de actividad fisiológica, y para reconstruir el origen filogenético de la estrategia gelatinosa.

El tratamiento y la preservación de las muestras para cada uno de estos objetivos son mutuamente incompatibles: una muestra que se seca y quema para la medición del contenido en carbono queda inutilizada para la identificación taxonómica o el *barcoding*. Por lo tanto, cada tipo de análisis consume una cantidad de muestra, pudiendo no haber suficiente para los tres tipos de análisis. Por lo tanto, se ha priorizado el análisis de acuerdo con la lista anterior, de modo que, si hay suficiente material, se recogerán los tres tipos de muestras. Sin embargo, si hay poco material, se muestreará solo para *barcoding* y taxonomía, y si hay muy poco se muestreará solo taxonomía. Existe la posibilidad de errores en la identificación de los animales que se usan para *barcoding* y contenido en carbono. Para que estos problemas puedan ser detectados y corregidos, se realizarán fotografías de alta calidad que permitan una identificación de esos animales a posteriori.

### *Procesado de muestras*

#### **p1.A LA LLEGADA DE LA PESCA**

- p1.1. Comprobar si hay zooplankton gelatinoso (ZG) en la pesca. La mejor forma es dividir la muestra en dos fracciones de tamaño, mediante un tamiz de 5000 micras. Si existen numerosas muestras, p.e. tomadas con multinet o Bioness, cada fracción se mantendrá en un recipiente dentro de un tanque isotérmico con agua atemperada, preparado para la recepción de muestras para evitar su deterioro por la diferencia de temperatura existente entre la cubierta y la columna de agua donde se pescaron.
- p1.2. Si hay ZG, y hay otros organismos no gelatinosos en esta fracción, verter el contenido de la jarra de 5000  $\mu\text{m}$  en una bandeja con un poco de agua, separando los organismos gelatinosos y no gelatinosos. Los *organismos no gelatinosos* de la fracción  $>$  de 5000  $\mu\text{m}$ , pueden fijarse en formol 4%, si es para taxonomía, o en etanol absoluto, si es para análisis genético. Los *organismos gelatinosos* se colocarán en una jarra con fondo de tamiz de 5000  $\mu\text{m}$  y esta se colocará en una gradilla en el tanque isotérmico preparado para la depuración de material gelatinoso.
- p1.3. Verificar si aún hay material de ZG en otros colectores. Si queda ZG ir a p1.2 y continuar triando material gelatinoso hasta que se procesen todos los colectores.

- p1.4. Dejar a los organismos en el agua filtrada del baño isotérmico durante 1 h para que defequen.
- p1.5. Hacer una pesada de todo el material gelatinoso contenido en cada una de las jarras. Retirar el agua excedente utilizando una malla de NYTAL y pesar el material en una bandeja de aluminio de tamaño proporcional a la cantidad de material gelatinoso recolectado. Utilizar los dinamómetros tipo “Pesola”. Para realizar las pesadas con el dinamómetro, la bandeja de aluminio se doblará en dos cuidando que no se caiga el material gelatinoso y se colocará la pinza del dinamómetro sujetando los bordes de la bandeja. Posteriormente se levantará el dinamómetro desde la mesa o superficie de trabajo despacio, haciendo que el resorte del dinamómetro se estire de forma lenta y gradual. Hacer 5 pesadas y anotar el promedio en el estadillo.
- p1.6. Cuando la muestra proviene de la pesca de algún enjambre de zooplankton gelatinoso y hay demasiados organismos ir al p.8. para procesar muestras de *blooms* de ZG. En el caso de que la muestra presente una abundancia y variedad de grupos que permitan procesar organismo por organismo ir a p1.7.
- p1.7. Triar la muestra de una de las jarras utilizando pinzas, garcilla, o coladores de acuario, poniendo cada individuo en un bote con agua filtrada. Los botes estarán previamente numerados y los individuos recolectados en cada jarra deberán irse adicionando a los botes ordenados por taxones, considerando cuantos individuos de cada taxón han sido recolectados de acuerdo al siguiente orden de prioridades:
- 1 Individuo – Muestra para sistemática.
  - 2 Individuos – Muestra para sistemática y para DNA *barcode*.
  - 3 Individuos – Muestra para sistemática y dos réplicas para DNA *barcode*.
  - 3 ≥ individuos – Muestra sistemática, DNA *barcode* y el resto para biomasa y CHN.
- p1.8. Anotar el código de cada uno de los botes en los cuales se fueron guardando los organismos recolectados. Cuando el número de organismos en cada colector es poco se puede poner toda la muestra de gelatinosos en un solo bote marcando en la tapa la fecha, número de colector y tipo de red.
- p1.9. Hacer una pesada del material gelatinoso residual o restante que no ha logrado separarse (por ejemplo, organismos incompletos y material gelatinoso que no se logre distinguir claramente). Anotar en estadillo.
- p1.10. Colocar los botes de cada individuo recolectado en la caja de almacenaje y pasar a la sección de fotografía P2.

## p2. FOTOGRAFÍA DE ZOOPLANKTON GELATINOSO

- p2.1. Conectar los dispositivos para la toma de fotografía (cámara, mesa de reprografía, sistema de iluminación y ordenador). En el anexo 1 se ejemplifica la disposición y configuración de un equipo de fotografía embarcado.
- p2.2. Los organismos se fotografiarán en el orden en el que fueron anotados al irse guardando en los botes numerados y ordenados individualmente en cada frasco. Si se utilizó un solo frasco para todos los organismos de un colector fotografiarlos por taxones, de forma que se pueda conservar el orden de procesamiento de las muestras.
- p2.3. Coger el individuo a fotografiar con pinza, garcilla o coladores de acuario y ponerlo sobre una placa de Petri con agua de mar filtrada con mentol (se puede también usar benzocaína o aceite de clavo) junto a una escala graduada de un tamaño adecuado. Si es una medusa, orientar los tentáculos hacia arriba (posición ventral de la medusa).
- p2.4. Disponer la bandeja en el centro de la mesa de reprografía, justo debajo del objetivo de la cámara. Mover el cabezal de la columna utilizando el control del motor hasta que el organismo a fotografiar cubra más de  $\frac{3}{4}$  y menos de 95% del campo de la imagen. En el caso de fotografías para muestras muy abundantes (viene de la sección de *blooms* p.8) que requieren cumplir la totalidad del campo de la fotografía será necesario quitar los anillos de extensión del objetivo macro para poder enfocar en su totalidad toda la muestra.
- p2.5. Utilizando la función de enfoque del *software* de control ("EOS Utility") enfocar el organismo, verificar que este enfocado todo el organismo especialmente los caracteres necesarios para su correcta determinación. Estos caracteres están ilustrados en el esquema de caracteres diagnósticos (Anexo 2) (Esquema de caracteres diagnósticos en el Anexo 1).
- p2.6. La cámara debe estar en el perfil de usuario C1 y modo M. Las fotografías deberán realizarse entre el siguiente intervalo de velocidad y apertura del diafragma de (f32, S250 / f11, S60). La combinación estará en función de que tan traslucido es el organismo que se pretenda fotografiar. Los valores de diafragmas cerrados y tiempos cortos se aplicaran para organismos traslucidos mientras que una combinación de diafragma abierto y un tiempo de exposición mas largo se aplicara a organismos mas opacos (ver volcado de pantalla de los controles de velocidad y apertura del diafragma de la cámara en el Anexo 3) .
- p2.7. Realizar tantas fotos como se considere necesario a cada individuo.



- p2.8. Apuntar el código de las fotografías en el estadillo. El código de las fotografías es el nombre del fichero de cada fotografía, para registrar el código anotar los últimos cuatro números del fichero fotográfico, separando con un guión hasta que fotografía corresponde al mismo individuo. Por ejemplo: 5AO20417-420; esto quiere decir que se tomaron tres fotografías que van del número 417 al 420 Indicando en el estadillo de la siguiente forma: 417-420 (ver Anexos 1 y 5).
- p2.9. Tras el fotografiado mantener a los organismos separados tras el triado e ir a p.3. para continuar con el muestreo de sistemática.

### p3. PROCESADO PARA SISTEMÁTICA

- p3.1. Seleccionar el primer individuo de cada taxón de la serie de frascos numerados o de un bote que contenga los organismos de todo el colector; los organismos se procesaran coincidiendo con el orden en el que fueron fotografiados.
- p3.2. De los botes de sistemática disponibles, seleccionar uno en el que el animal esté holgado (p.e. que ocupe un 10% a lo más del volumen interior del bote que se vaya a utilizar).
- p3.3. Rellenar con las cantidades adecuadas de formol al 40% taponado con bórax y agua de mar filtrada para obtener una concentración final de formol al 4%, utilizando las jeringuillas destinadas a este fin.
- p3.4. Etiquetar de acuerdo con la sección p7.
- p3.5. Sellar bote con sistema de precintado y almacenar en la correspondiente caja de almacenaje de muestras en formol de gelatinosos.
- P3.6. Si quedan más organismos de este mismo taxón ir a p.4 para muestreo de DNA Barcode.
- p3.7. Si quedan organismos de otros taxones ir a p3.1.
- p3.8. Si quedan organismos en otras jarras correspondientes a otro colector ir a p1.7. Si no quedan más organismos apagar de acuerdo a la sección p.9.

### p4. MUESTREO PARA DNA BARCODE

- p4.1. Para esta finalidad se requieren dos ejemplares, sin embargo si solo se dispone de uno, además del ejemplar de sistemática, el segundo se utilizara para *barcoding*.
- p4.2. Si el animal entra en el bote de *barcoding* (criovial de 15ml) y deja 90% del volumen interior libre ir a 4.4. Si el animal no entra en el bote o no deja 90% de su interior libre, pasar a p4.3.
- p4.3. Cuando el animal no entra en el bote de *barcoding* se deberá tomar un trozo de tejido preferentemente de los brazos o del margen de la campana. Es necesario utilizar pinzas estériles o que

previamente hayan sido pasadas por un mechero bunsen o una lámpara de alcohol, el fragmento de tejido se almacena en un bote de *barcoding*. Los restos del organismo se guardan en un frasco separado con etiquetado para taxonomía (atención, no para genética) pero indicando que es la réplica 2, pues ya existe un frasco con la misma codificación proveniente del punto p2. Anotar en *Observaciones* de la muestra obtenida para genética que “los restos del organismos están en el frasco de código ‘indicar código digital’”.

- p4.4. Introducir el fragmento o el individuo en un bote de *barcoding* meterlo en el bote usando pinzas, rellenar el bote con etanol absoluto usando un frasco lavador.
- p4.5. Etiquetar de acuerdo con las instrucciones de la sección p7. Como el procesado implica la utilización de dos frascos con ejemplares del mismo taxón y mismos muestreos, etc., se etiquetarán considerándolos replicados.
- p4.6. Pasar el bote de *barcoding* por nitrógeno líquido usando una media y almacenar en el congelador a -80 °C. Guardar en el contenedor designado para las muestras de DNA Barcoding en el congelador.
- p4.7. Si quedan más organismos en los botes pasar a la sección de biomasa y CHN. Si quedan organismos en otras jarras correspondientes a otro colector ir a p1.7. Si no quedan más individuos apagar de acuerdo a la sección p.9.

#### **p5. MUESTREO PARA CONTENIDO EN CARBONO**

- p5.1. Seleccionar una bandeja de aluminio que se adapte al tamaño del individuo más grande que quede del triado. En la base de todas las bandejas está escrito su peso, anotarlo en el estadillo. Coger el individuo más grande que quede.  
En las pesadas se agregarán los individuos por intervalos de tamaño procurando que cada bandeja contenga individuos de tamaños similares. Cada bandeja representa una réplica que está orientada a construir una regresión de C *vs* peso fresco en cada especie, por lo que se deben ir agregando primero los organismos más grandes, en la siguiente bandeja los siguientes más grandes y así de forma sucesiva.
- p5.2. Se retira el exceso de agua a los organismos con papel secante y una tela de NYTAL. Esta operación se realiza utilizando los diferentes tipos de coladores y la tela de NYTAL.
- p5.3. Utilizando el dinamómetro de 30 g de capacidad máxima tipo “Pesola” (0.1 mg de precisión). Registrar el peso por organismo de la misma especie hasta completar 10 g. Las pesadas deberán realizarse de la siguiente manera: se deben ir añadiendo de uno

en uno a la bandeja, e ir anotando el peso de la bandejas + 1 individuo, bandeja + 2 individuos, bandeja + 3 individuos, bandeja + n individuos, de modo que al final se dispondrá del peso total de todos los individuos y del peso de cada individuo hasta completar 10 g. Si los organismos pesan menos que los 0.1mg que el dinamómetro puede registrar estos deberán ir agregándose hasta tener los 0.1 mg. Se deberá registrar, en el estadillo de trabajo cuantos individuos se colocaron en la bandeja para poder registrar la variación en el dinamómetro.

p5.4. Quedan más organismos de la misma especie. Ir a p5.1. tantas veces como se requiera para completar bandejas de 10 g.

p5.5. Poner a secar la bandeja de acuerdo con la sección p6.

p5.6. Si aún quedan individuos de ese taxón en los frascos numerados, ir al punto p4.2., teniendo en cuenta para el etiquetado que los frascos que se originen a partir de ahora serán réplicas de este primero.

Si no hay más ejemplares, el muestreo de este taxón ha acabado. Si queda algún frasco con otro taxón (uno o varios individuos), ir a empezar en la sección p3 y procesar cada individuo en el orden que fueron fotografiados.

Si quedan organismos en otras jarras correspondientes a otro colector ir a p1.7. Si no quedan más taxones, el muestreo ha finalizado. Apagar el equipo según p9.

## **p6. SECADO DE ZOOPLANKTON GELATINOSO**

p6.1. Verificar que la temperatura de la estufa este a 60 °C.

p6.2. Cerciorarse de que la bandeja de aluminio tenga registrado su código digital en el estadillo y adherir la etiqueta correspondiente a cada bandeja (ver sección p.7).

p6.3. Secar en la estufa a 60 °C durante 48 h.

p6.4. Pasado el tiempo de secado y evaporación en la estufa sacar las bandejas con las muestras de la estufa, cortarlas y doblarlas en forma de sobre. Cada bandeja se introducirá en una bolsa tipo zip que tendrá pegada en su exterior una etiqueta idéntica a la de la bandeja. Dentro de cada bolsa se introducirá silicagel para evitar la humedad.

p6.5. Almacenar en el sitio designado para muestras de CNH.

## **p7. ETIQUETADO DE MUESTRAS DE SISTEMÁTICA Y BARCODING**

Crear cada etiqueta por separado, una vez que se tiene el frasco con el organismo, preferentemente con un sistema de generación de etiquetas que evite repeticiones de códigos, teniendo en cuenta que todos frascos generados a partir de una sola muestra y para la misma finalidad (taxonomía, genética o CNH) serán considerados replicados entre sí. Si la muestra

es para taxonomía meter una etiqueta de papel vegetal en el bote con el código digital del frasco. Colocar la etiqueta en el frasco o bandeja protegida por cinta adhesiva transparente.

p7.2. Registrar en el estadillo los siguientes datos de cada bote:

- Número asignado para su proceso previo a la asignación del código digital. Este número también indica el orden en que las muestras fueron procesadas. Este número es consecutivo y deberá indicarse en el estadillo del trabajo.
- Código digital de cada frasco.
- Taxón: Si se determinó o en su defecto marcar como Zooplankton gelatinoso.
- Nº de organismos incluidos en cada frasco.
- Códigos fotos: MK 134-137. Esto indica que para este individuo, se han hecho las fotos 134 a 137 con la cámara Mark III de la mesa de reprografía.
- Peso bandeja.
- Peso fresco total bandeja + muestra.
- Observaciones: las que procedan.

Volver a p3.5. si es sistemática.

Volver a p4.5. si es DNA *barcoding*.

### **p8.0. BLOOMS**

Cuando la muestra proviene de la pesca de algún enjambre de zooplankton gelatinoso y hay demasiados organismos del mismo o de diferentes taxones el muestreo presenta las siguientes variaciones que permiten obtener la mayor cantidad de datos de biomasa y optimizar el procesamiento de los organismos recolectados.

Viene del p1.7.

p8.1. Realizar una pesada de toda la muestra. En el caso de no poder hacer una pesada de toda la muestra debido a la abundancia de los organismos pescados, la muestra se repartirá en bandejas de aluminio, previamente pesadas. Los organismos contenidos en cada una de las bandejas serán una submuestra. Se realizarán 5 pesadas de cada una de las submuestras. Los valores de todas las pesadas y de las bandejas se anotarán en el estadillo para posteriormente determinar un valor total de la biomasa de ZG recolectada. Cada una de las submuestras será fotografiada y procesada siguiendo el orden de prioridades del muestreo.

p8.2. Hacer fotografía de toda la muestra (ver p2. para detalles sobre la preparación del equipo fotográfico). En caso de que no se pueda fotografiar toda la muestra en una sola fotografía, se realizarán varias fotografías, colocando en la placa Petri de mayor diámetro disponible los organismos. Es importante que cada organismo se

pueda diferenciar de otro en la fotografía, por lo que el número máximo de organismos estará determinado por el número de organismos que permiten diferenciarse en la imagen. Es importante mantener la referencia de tamaño en la imagen o registrar el diámetro de la placa Petri en la sección de observaciones del estadi-  
llo de trabajo.

- p8.3. Se conservará el orden de prioridades de muestreo (sistemática, *barcode*, CNH), por lo que una vez procesados los organismos para sistemática y para *barcode* el resto se irán pesando completando bandejas de 10 g como se describe en el p.5.3. Si el número de organismos recolectadas en la muestra no permite procesarla en su totalidad, se procesarán tantas muestras como sea posible y con el material restante se procederá como se indica en el p8.4.
- p8.4. El caso de que el material de una sola especie sea tan abundante que resulte imposible de pesar cada individuo se procederá de la siguiente forma:

Se realizarán fotografías y posteriormente se guardarán preservados en formol (utilizando botes de 500 o 800 ml) todos los individuos recolectados procediendo como se indica a continuación:

Los individuos se colocarán en una placa Petri con una escala espacial y un número que indicará cuántas placas Petri con individuos de esa muestra fue necesario fotografiar para completar toda la muestra. Se indicarán en el estadi-  
llo los códigos de foto y se anotará en observaciones que no se determino el peso.

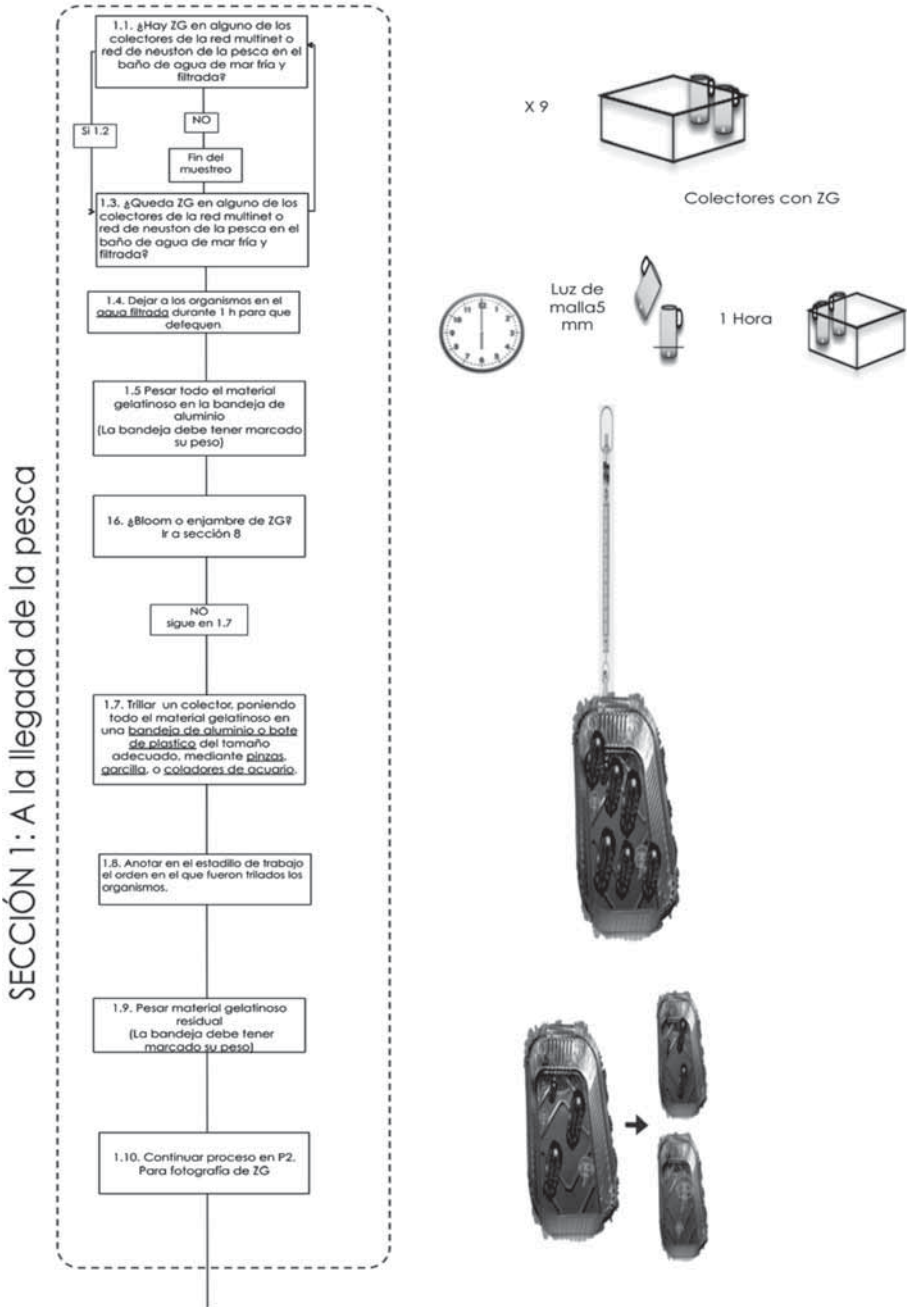
Estos individuos se colocarán en un bote 500 u 800 ml dependiendo del tamaño y número de organismos y se preservarán en formol.

## P9.APAGADO DEL EQUIPO

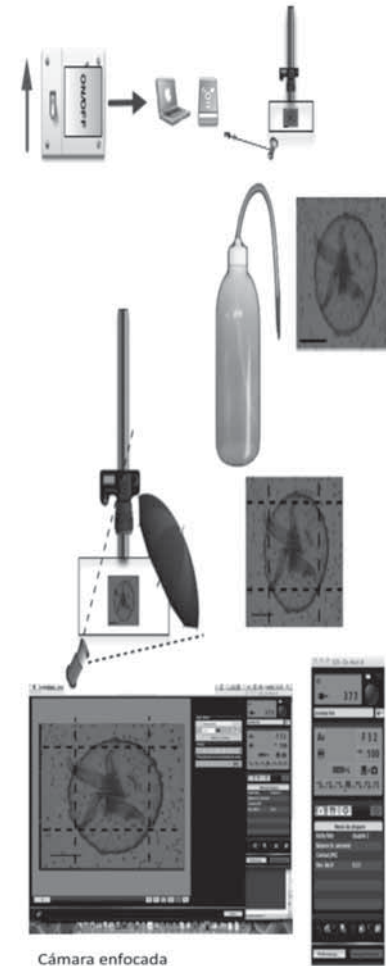
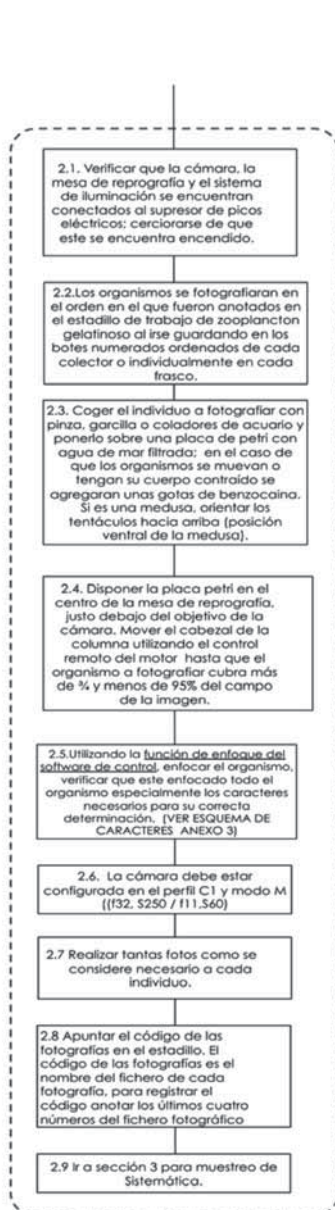
Para terminar la parte fotográfica seguir esta secuencia.

- P9.1. Apagar y desconectar fuentes de iluminación (*flashes*).
- P9.2. Apagar el motor de la columna.
- P9.3. Hacer *backup* usando *software* de respaldo "Time machine".
- P9.4. Cerrar *software*.
- P9.5. Desconectar cámara del ordenador (conector USB)
- P9.6. Apagar cámara.
- P9.7. Revisar y llenar estadi-  
llo correspondiente al material obtenido durante el día.
- P9.8. Apagar ordenador.

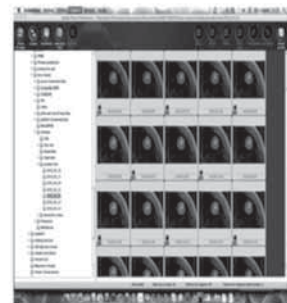
Cuadro sinóptico de la técnica



## SECCIÓN 2: Fotografía de Zooplancton Gelatinoso

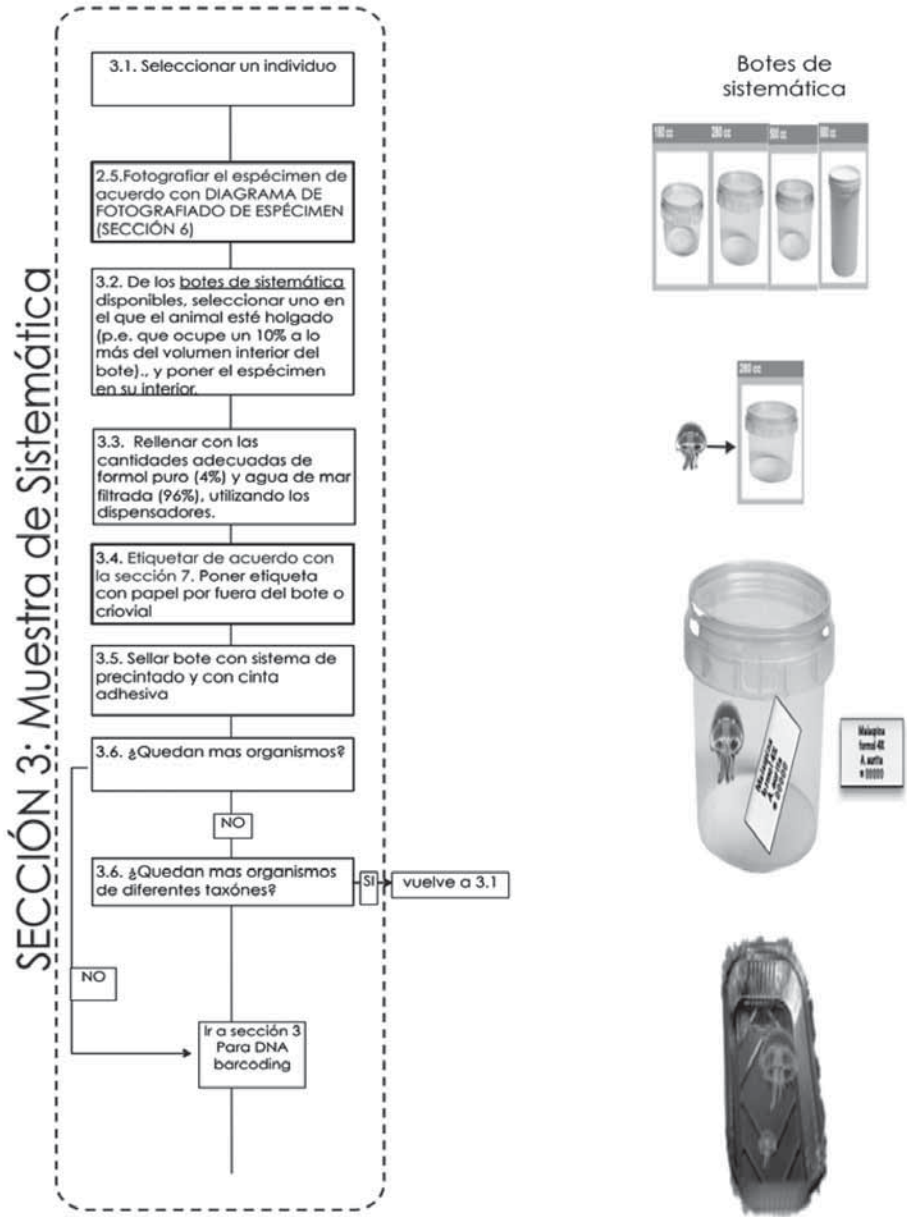


Cámara enfocada adecuadamente desde el software



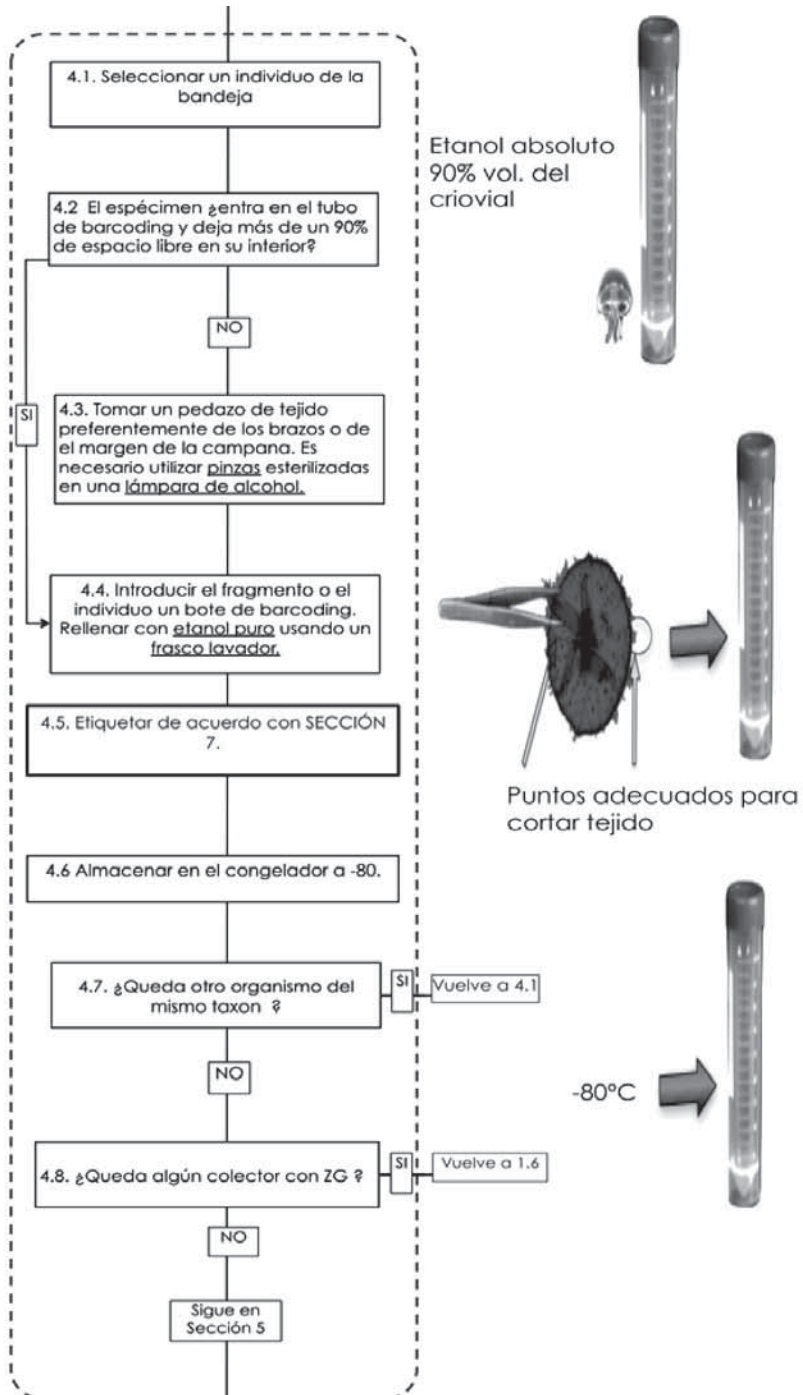
Software de administración de archivos fotográficos



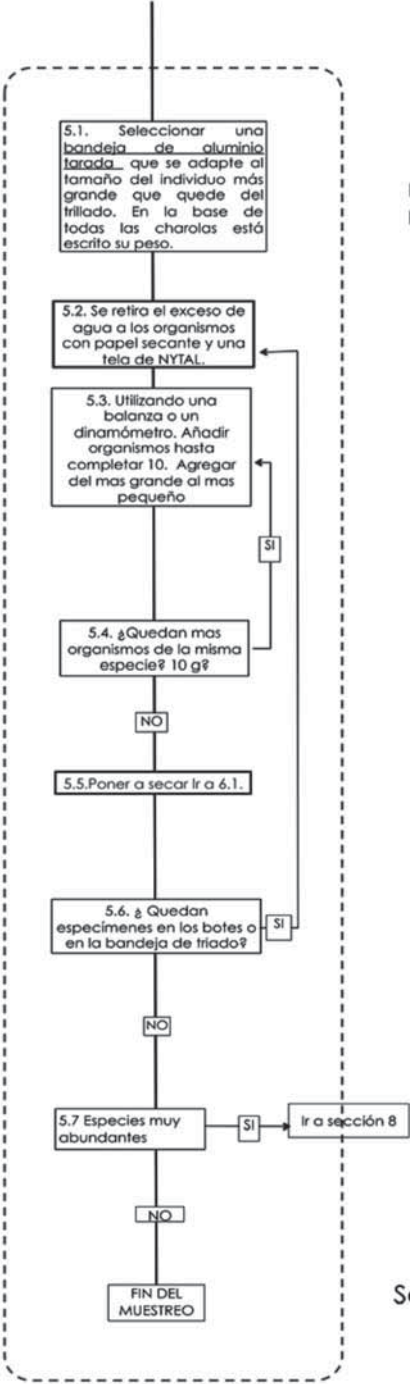




## SECCIÓN 4: Muestra de DNA BARCODE



SECCIÓN 5: Pesado para biomasa y CNH



Bandeja de aluminio pesada previamente

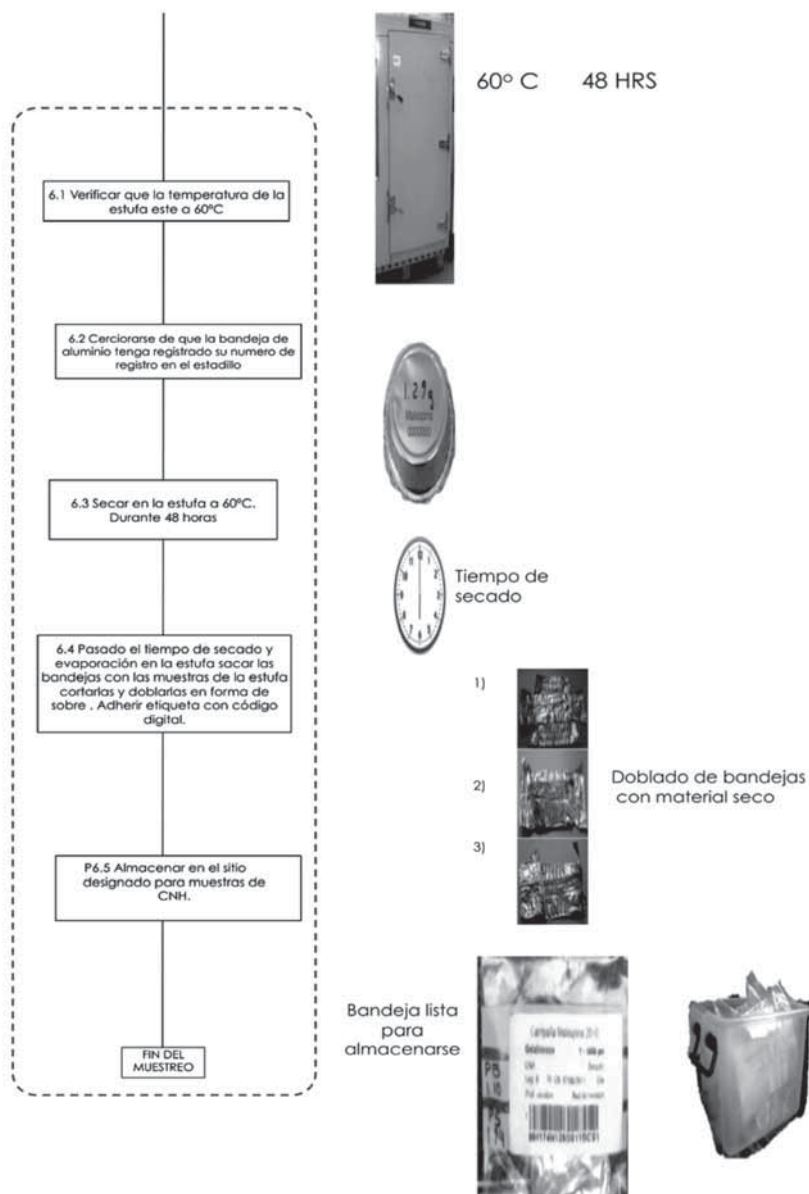


Se retira el exceso de agua



Se pesa material gelatinoso X5.

## SECCIÓN 6: Secado para determinación de CNH



SECCIÓN 7: Diagrama de etiquetado  
(previo a la asignación de un código digital)

**Número de muestra:** 0000

**Campaña:** Malaspina

**Medio en el que esta preservada la muestra:** Etanol /  
Formol

**Estación y profundidad:** 1 -160 / 1-9

**Taxón:** Si es posible de identificar o en su defecto  
marcar como Zooplankton gelatinoso

Sistemática y barcode: Etiqueta en la pared del bote o del  
criovial

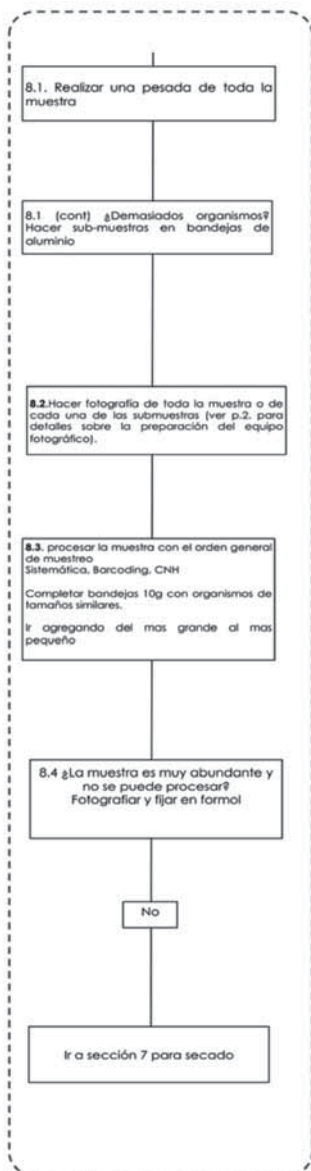
**Número de bandeja:** 0000

**Campaña:** Malaspina

**Estación y profundidad:** 1 -160 / 1-9

Marcar sobre la base de la bandeja de  
aluminio

## SECCIÓN 8: Blooms de ZG



## SECCIÓN p7: FOTOGRAFÍA ZG



## Control de calidad

Por motivos relacionados al movimiento del barco existe cierta variación en los resultados del peso húmedo, por lo que se realizan 5 pesajes y se considera el valor de la media. Se contempla el uso de pesas de referencia para calibrar constantemente la balanza.

Las referencias de tamaño utilizadas en las fotografías deberán de ser iguales y se conservarán para evaluaciones posteriores y procesos de post-calibración de las fotografías.

## Otras técnicas similares

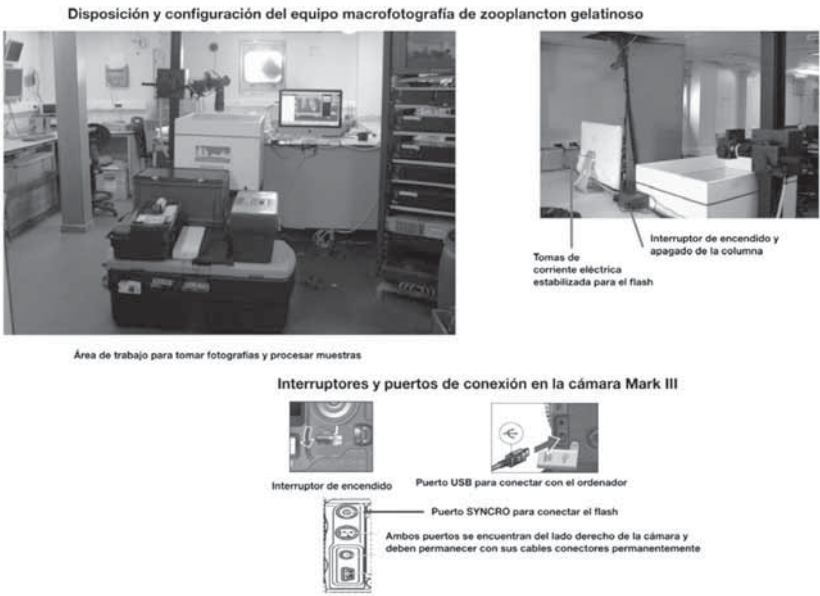
No hay una técnica específica que englobe el tratamiento de muestras de zooplankton gelatinoso en un solo flujo de trabajo que comprenda la obtención de imágenes digitales, la obtención de muestras para análisis molecular y el procesamiento de material para análisis de CNH. Sí existen protocolos o técnicas para el fotografiado de plancton gelatinoso (Svoboda, 1992; Haddock, 2011), para el muestreo de *barcoding* (Dawson et ál. 1998), para el análisis de CHN en zooplankton, (Postel et ál. 2000; Larson, 1986). Este protocolo integra los diferentes enfoques de procesamiento de muestras de zooplankton gelatinoso en un solo flujo de trabajo.

## Referencias

- DAWSON, M. N, K. A. RASKOFF, D. K. JACOBS. 1998. «Preservation of marine invertebrate tissues for DNA analyses». *Mol. Mar. Biol. and Biotechnol.* 7: 145-152.
- HADDOCK, S. H. D. 2011. «Photographing your jellyfish». *Make Magazine* 27: 91.
- LARSON, R. J. 1986. «Water content, organic content, and carbon and nitrogen composition of medusae from the northern pacific». *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 99: 107-120.
- POSTEL, L., H. FOCK; W. HAGEN. 2000. «Biomass and Abundance». En R. P. HARRIS, P. H. WIEBE, J. LENZ, H. R. SKJOLDAL, y M. HUNTLEY (eds.). *Zooplankton Methodology Manual*. Academic Press, San Diego, California, pp. 83-174.
- PURCELL, J. E., M. V. STRUDEVANT. 2001. «Prey selection and dietary overlap among zooplanktivorous jellyfish and juvenile fishes in Prince William Sound». Alaska. *Mar. Ecol. Progr. Ser.* 210: 67-83.
- RICHARDSON, A., A. BAKUN, G. HAYS, M. GIBBONS. 2009. «The jellyfish joyride: causes, consequences and management responses to a more gelatinous future». *Trends Ecol. Evol.* 24: 312-322.
- SVOBODA, A. 1992 «Close-up photography of marine life on board research vessels». *Sci. Mar.* 56 (2): 239-244.

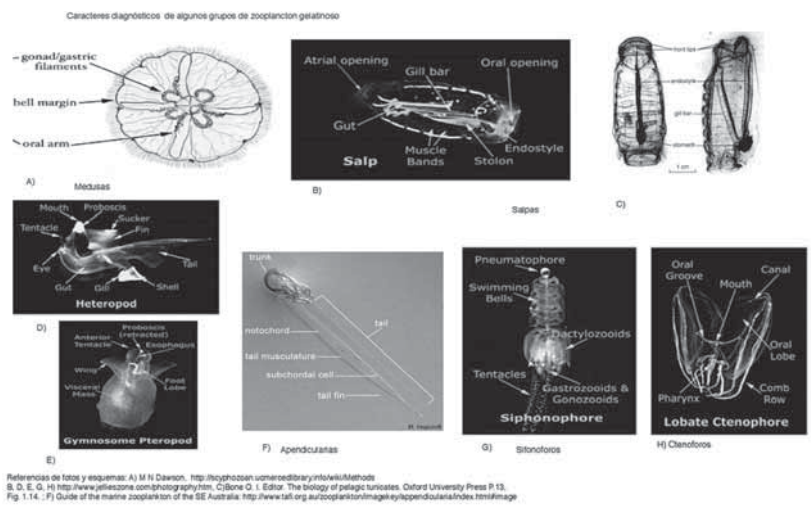


Anexo 1



Equipo de fotografía instalado para el trabajo a bordo del *BIO Hespérides*.

Anexo 2



Esquema de caracteres diagnósticos de los principales taxones de zooplancton gelatinoso.



*Anexo 3***Disposición y configuración del equipo macrofotografía de zooplancton gelatinoso**

Área de trabajo para tomar fotografías y procesar muestras



Interrupor de encendido y  
apagado de la columna

Tomas de  
corriente eléctrica  
estabilizada para el flash

**Interruptores y puertos de conexión en la cámara Mark III**

Interrupor de encendido



Puerto USB para conectar con el ordenador



Puerto SYNCRO para conectar el flash

Ambos puertos se encuentran del lado derecho de la cámara y  
deben permanecer con sus cables conectores permanentemente

Interfaz de control de la cámara fotográfica Canon Mark III.



# Procesado de muestras de zooplancton para análisis de actividad enzimática

Hernández-León, S.

*Instituto de Oceanografía y Cambio Global, ULPGC*

## Finalidad. Campo de aplicación

Obtener la distribución vertical y regional de la actividad de las enzimas responsables de la respiración en zooplancton.

## Conceptos generales

Medir la respiración en el océano consume mucho tiempo a bordo de los buques oceanográficos. La resolución espacial que se obtiene es muy pequeña por lo que desde hace décadas se utiliza la actividad del sistema de transferencia de electrones en las células como índice de la respiración.

## Equipamiento necesario

Red de zooplancton.  
Arcón congelador -80 °C.

## Reactivos u otro material fungible

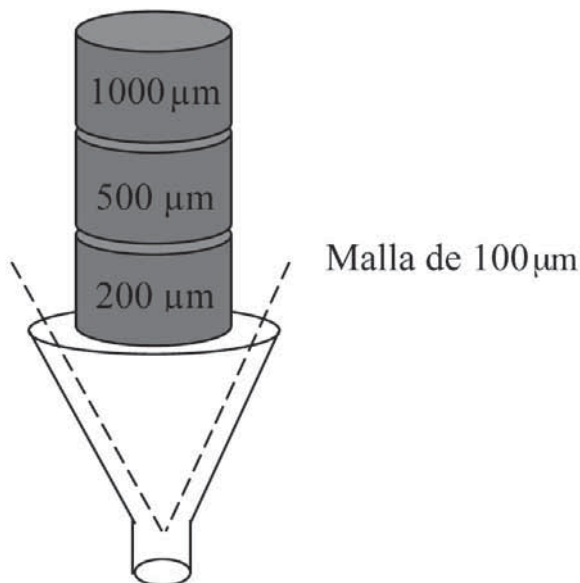
- Nitrógeno líquido.
- Pulverizador/es (tipo *matabi*).
- Embudos, varios tamaños.
- Cubos.

- Tubos eppendorf con tapa agujereada de 2ml.
- Punzón.
- Crioviales de 5 ml.
- Bandejas.
- Mallas de tamaño igual o inferior a la luz e malla de la red utilizada.
- Pinzas, espátulas.
- Rotuladores permanentes para etiquetar los viales.
- Papel de filtro.
- Tren de tamices de 1000, 500 y 200  $\mu\text{m}$ , y malla de 100  $\mu\text{m}$ .
- Cinta criogénica para rotular.
- Media para  $\text{N}_2$  líquido.
- Gradilla para ultracongelación (cartón).
- Lechera con Nitrógeno líquido.
- Estadillo.
- Material etiquetado.

### Descripción de la técnica

#### *Procesado de muestras:*

Se vierte la muestra sobre una columna de pequeños tamices de 1000, 500 y 200  $\mu\text{m}$ . Es importante asegurarse de que están en este orden para evitar perder parte de la muestra.



El contenido del tamiz de 1000  $\mu\text{m}$  se vierte con la ayuda de un pulverizador sobre una malla de forma cuadrada de 100  $\mu\text{m}$  dispuesta en un embudo en forma de “filtro de café”. Con un pulverizador se concentran los organismos en el centro de la malla.



Se abre la malla y se coloca sobre un papel secante, de tal forma que se retira el máximo de agua de la muestra.

Con una espátula se recogen los organismos y se pasan a un criovial (eppendorf). Este debe tener un pequeño orificio en la tapa hecho con un punzón para dejar pasar el aire y evitar que estalle tras la congelación. Nunca llenar los viales hasta arriba. Es mejor recoger en dos viales. Apuntar siempre en cuantos viales se ha introducido una misma muestra.



Cerrar el Eppendorf. **COMPROBAR QUE LA TAPA DEL EPPENDORF TIENE UN PEQUEÑO AGUJERO.** Nunca congelar sin comprobar esto pues el tubo se partiría al contacto con el nitrógeno. Se introducen los crioviales en una media o similar y a continuación en nitrógeno líquido para su congelación inmediata.

Repetir el proceso para los tamices de 500 y 200  $\mu\text{m}$ . Cuando están todas las muestras procesadas se recuperan los crioviales y se colocan dentro de la caja de congelación de cartón. Después se llevan a la cámara congeladora de  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  para su almacenaje definitivo. Etiquetar la caja de congelación.

*Etiquetado:*

Inicialmente hay que tener los crioviales ordenados y rotulados, con rotulador indeleble, con el número de código de muestra y el rango de profundidad muestreado. La letra debe ser muy clara, sin tachaduras.

Cada numeración debe ser cubierta por cinta criogénica para que aguante el frío. Etiquetar también el tapón para que cuando se desconge-len las muestras no se borre al manipularlas. Este número puede anotarse en el estadillo, apartado observaciones.

# Muestreo de zooplancton neustónico

<sup>1</sup>González-Gordillo, J. I.; <sup>1</sup>Sánchez, R.; <sup>2</sup>Fernández Puellas, M. L.

<sup>1</sup>CACYTMAR, Universidad de Cádiz.

<sup>2</sup>Instituto Español de Oceanografía, Mallorca

## Finalidad. Campo de aplicación

Metodología para obtener muestras de neuston de la fracción mayor de 200  $\mu\text{m}$ , válida tanto para estudios cualitativos como cuantitativos.

## Conceptos generales

Se conoce como neuston a la comunidad de organismos planctónicos que vive en la escueta capa de agua que se extiende desde la superficie hasta unos pocos centímetros inmediatamente por debajo de ella. En esta capa, directamente sometida a las condiciones meteorológicas, se producen importantes intercambios atmósfera-océano, además de presentar una composición taxonómica generalmente diferente a la encontrada algunos decímetros más abajo.

## Equipamiento necesario. Características técnicas

Red planctónica para neuston. Este equipo básicamente consiste en una red de plancton montada sobre un armazón rígido, al que se le acoplan unos flotadores que hacen que el conjunto navegue por la superficie del mar sin hundirse.

La boca de la red debe ser rectangular para delimitar mejor el estrato que se pretende muestrear. La red deberá estar provista de un flujómetro para cuantificar el volumen muestreado. Este debe colocarse por debajo de la boca de la red y unos 20 cm separado de esta, para que su funciona-

miento no se vea perjudicado por las turbulencias del armazón de la red. Otros equipos, como un pequeño CTD, podrían ser acoplados a la estructura para obtener datos hidrológicos del transecto muestreado. Deberá observarse cual es el área efectiva de entrada de agua por la red, pues no toda la boca de la red queda sumergida en el agua.



## Descripción de la técnica

### *Preliminares*

Verificación de grilletes, colectores y estado de la red. Cumplimentar el estadillo de datos. Elaboración de etiquetas. Puesta en marcha de equipos accesorios que lleve acoplados (CTD, etc.).

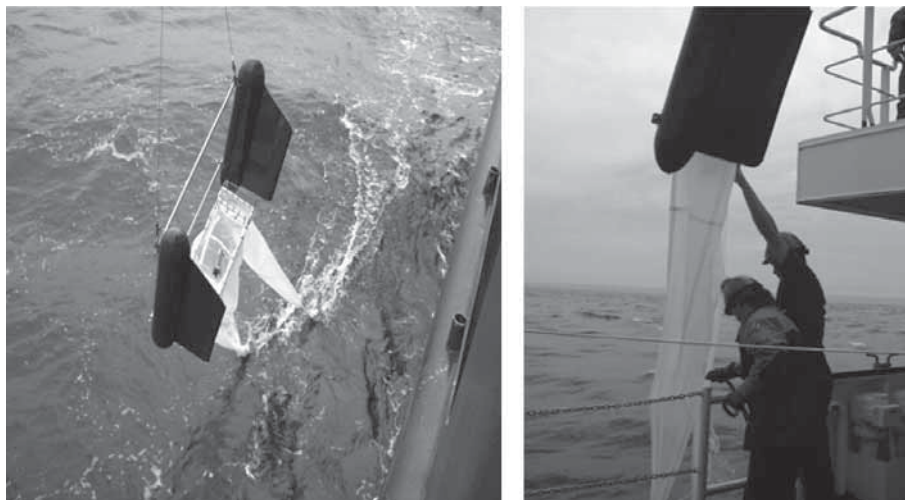
### *Largado del equipo*

Las muestras se toman realizando transectos horizontales superficiales. La red debe ser largada por una de las bandas del barco y nunca por la popa, pues la turbulencia de las hélices altera la distribución natural de los organismos que se pretenden muestrear. Por tal razón, la red debería “navegar” por una zona no perturbada por el barco.

Antes de iniciar la maniobra de arriado, el barco debe ponerse a navegar según el rumbo preestablecido y a una velocidad constante de 2 nudos. Es conveniente que el timón esté metido 5° hacia el costado por el que va a trabajar la red, esto hará que el barco mantenga su popa separada de la red y se eviten incidentes.

A continuación se baja la red suavemente por el costado del barco, separada un par de metros del casco y ayudándose de un pequeño cabito que iría preso en una de las cogidas de los tirantes de arrastre. Con este cabito es más fácil orientar la red para que se pose en el agua de forma correcta. Una vez posada en el agua, se larga cable hasta que la red esté casi a la altura de la popa. Dependiendo del estado de la mar puede ser conve-





niente largar más cable para estabilizar la red, pues esta siempre debe trabajar totalmente asentada sobre la superficie del agua.

El diseño de la red debe permitir que la parte superior de la boca de entrada quede siempre fuera del agua, de forma que se evite que los organismos distribuidos superficialmente pasen por encima de la boca de la red y no sean muestreados.

El tiempo de muestreo puede ser de unos 10 min, aumentándose este tiempo si la cantidad de organismos colectados es pequeña.

### *Recogida de muestras*

La limpieza de la red se realiza fácilmente con esta colgada desde el chigre y una manguera a presión de agua de mar (generalmente se usa la manguera contra-incendios del barco), quedando todo el material filtrado concentrado en el colector final.

### *Conservación de muestras*

Todo el material colectado se pasa a un conjunto de jarra-tamiz, compuesto por una jarra de fondo cerrado y otra dentro de la primera con fondo malla de 5000  $\mu\text{m}$ , con la ayuda de un pulverizador y agua de mar filtrada, con la idea de separar organismos grandes del resto, especialmente los gelatinosos. Antes de pasar a conservar el material es importante comprobar si existe material gelatinoso. Organismos como los ctenóforos se deshacen al contacto con el formol y hacen que la muestra sea muy difícil de analizar.

**Fracción > 5000  $\mu\text{m}$ :**

El contenido de la jarra de 5000  $\mu\text{m}$  se vierte en una bandeja con un poco de agua filtrada, separando los organismos gelatinosos y no gelatinosos. Los organismos no gelatinosos de la fracción > de 5000  $\mu\text{m}$ , se fijan en formol 4% o en etanol absoluto para análisis genético. Ambos tipos de muestras van colocados en un frasco hermético (p.e. de tapón de estrella) de 50 ml. Los organismos gelatinosos podrán procesarse según el protocolo específico para muestras gelatinosas (ver capítulo correspondiente).

**Fracción < 5000  $\mu\text{m}$ :**

Al contenido de la jarra de fondo cerrado se le añade agua de mar filtrada hasta enrasar entre 600-1000 ml. Con otra jarra similar y transvasando de una jarra a otra repetidas veces se consigue un buen mezclado de la muestra, para posteriormente dividirla en tantas partes iguales como análisis diferentes queramos realizar (taxonomía, genética, isótopos, etc.).

En caso de querer conservar muestras para taxonomía la división correspondiente se pasa a un frasco de 250 ml de tapón de estrella y se le añaden 25 ml de Formaldehído filtrado al 40% saturado con Bórax. Añadir agua de mar hasta aforar a 250 ml (muestra+conservante) para llegar a la proporción del 4% de conservante. Un sistema rápido y seguro para medir el volumen de conservante es utilizar una jeringuilla de boca ancha de unos 50 ml con un filtro desechable.

Para la muestra para fines genéticos la parte de la muestra correspondiente se concentra en un tamiz de 200  $\mu\text{m}$ , dejando que escurra la mayor parte del agua y seguidamente se pasa a un frasco de 50 ml con la ayuda de un frasco lavador relleno de etanol absoluto y un embudo.

*Etiquetado*

No escribir directamente sobre el frasco, se borra con los conservantes o por el propio manejo. Etiquetar siempre sobre etiquetas adhesivas. Cada etiqueta debe ser cubierta por cinta de precinto transparente suficientemente ancha como para cubrir sobradamente la etiqueta. Verificar los datos de la etiqueta con los datos del muestreo y estadillo.

*Recogida de material*

Lavar bien la red y colectores con agua dulce después de cada uso. Inspeccionarlas por si existe alguna rotura. Cubrir la red con una loneta o plástico para protegerla de suciedad o posibles quemaduras.

Al final de cada etapa la red debería limpiarse en profundidad introduciéndola una noche en un tanque con agua dulce y un poco de lejía. En caso de estar muy estropeada cambiarla por una nueva.

### *Estadillo de datos*

Hora inicio (UTC), Latitud inicio, Longitud inicio, Fluj. Inicio, Ref Fluj., Estado Mar, Hora fin (UTC), Latitud final, Longitud final, Fluj. Fin, Vel viento (Kn), Estado del cielo, Observaciones, código muestras, Volumen alícuota de cada muestra.

### **Reactivos u otro material de laboratorio**

- Formaldehído al 40% tamponado con Bórax.
- Etanol absoluto.
- Un juego de jarras-tamiz de 5000 micras.
- Jarra plástico de 2 l.
- Jarra de 1 l graduada.
- Pinzas plástico.
- Jeringuillas de 12 y 60 ml.
- Frasco lavador para etanol.
- Filtros para jeringuillas.
- Bandeja triado.
- Tamiz de 200 micras.
- Embudo para etanol y portaembudos.
- Cronómetro.
- Pulverizador para limpieza del colector de la red.
- Frascos de 250 y 50 ml.
- Material de etiquetado.
- Estadillo.

### **Calibración**

Debe evitarse que sucedan casos de colmatación de la red o de retroceso del agua a filtrar, debidos a una elevada abundancia de organismos filtrados o una rápida velocidad de muestreo. Ambas circunstancias podrían evitarse realizando muestreos preliminares.

### **Cálculo de los resultados**

El cálculo del volumen filtrado se obtendría según la siguiente expresión:

$$Vol. filtrado = A * (Dig_2 - Dig_1) * C$$

siendo, A el área de la boca de la red; Dig<sub>2</sub>, la lectura final del flujómetro; Dig<sub>1</sub>, la lectura inicial del flujómetro; C, constante suministrada por el fabricante referente al valor (longitud) a que equivale un revolución del flujómetro. No obstante, debe tenerse en cuenta que no toda la boca de la red

queda sumergida por lo que debería restarse en los cálculos el área de la boca que se estima que queda fuera del agua.

### **Control de calidad**

Aunque organismos superiores al centímetro pueden ser recogidos mediante esta técnica, debería cuestionarse su uso para estudios cuantitativos, pues su número podría estar subestimado debido al tamaño de boca de entrada del muestreador y a la alta capacidad de evasión de los organismos superiores a este tamaño.

### **Otras técnicas similares**

Pueden obtenerse muestras de neuston de fracciones más pequeñas del plancton (micro, nano o picoplancton) mediante el uso de botellas horizontales o recogida directa mediante frascos tomamuestras.

# Descripción de procedimientos para trabajos de acústica con sonda EK60

Martínez, U.

*AZTI – Tecnalia, Pasaia*

## Finalidad. Campo de aplicación

Establecer un índice que permita estimar la abundancia de peces y macrozooplankton para estudiar el comportamiento del mismo en diferentes climas y ecosistemas.

## Conceptos generales

El macrozooplankton, juega un papel clave en el ecosistema y es un eslabón trófico clave entre diferentes especies de peces. No obstante, el macrozooplankton es tedioso de cuantificar mediante métodos de muestreo y de procesamiento clásicos, como las muestras planctónicas obtenidas por redes de plancton, por lo que los resultados necesarios para su análisis demoran mucho tiempo en tenerse disponibles.

Por otra parte, aunque en las zonas costeras las estimas de abundancia de peces son comunes, estas son mucho menos frecuentes en las zonas oceánicas. Además, por lo general, estas estimas son más consideradas en ecosistemas polares y descuidadas en templados. En particular no existen estimas globales de la abundancia de peces mesopelágicos.

Las ecosondas son equipos acústicos que detectan fauna subacuática que, mediante la respuesta de retorno del sonido transmitido, transforman la señal recepcionada en un valor de energía, pudiendo así calificar la fauna que se encuentra. Cada ecosonda tienen una frecuencia de transmisión, y según la frecuencia tienen diferente respuesta frente a los diferentes cam-

bios de densidad, por lo que mediante un análisis multifrecuencia se podrían identificar los diferentes tipos de fauna, y poder convertir ese valor de respuesta en un índice de abundancia.

### Equipamiento necesario

- Ecosonda Simrad EK60 “split-beam” 38 Khz y 120 Khz.

### Descripción de la técnica

Grabación de registros acústicos con sonda EK60 de 120 Khz y 38 Khz.

### *Procedimiento de actuación*

Al comienzo de cada campaña se procederá a dar inicio a la grabación de datos acústicos originados por la sondas EK60 en sus dos frecuencias, de la siguiente manera:

Ejecutamos el programa ER60 de captura de datos.

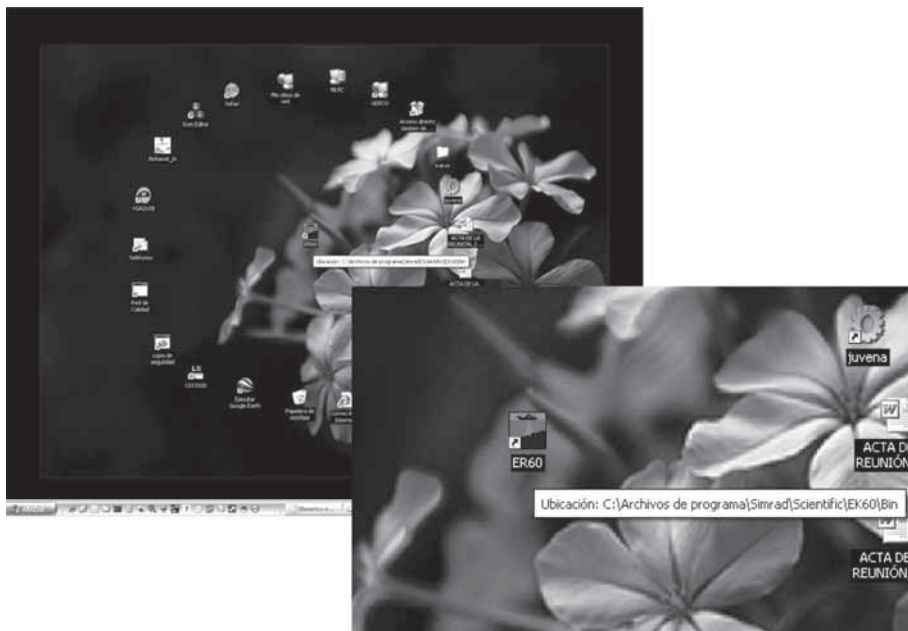


Figura 1. Icono del programa ER60.

Se abre la siguiente ventana:

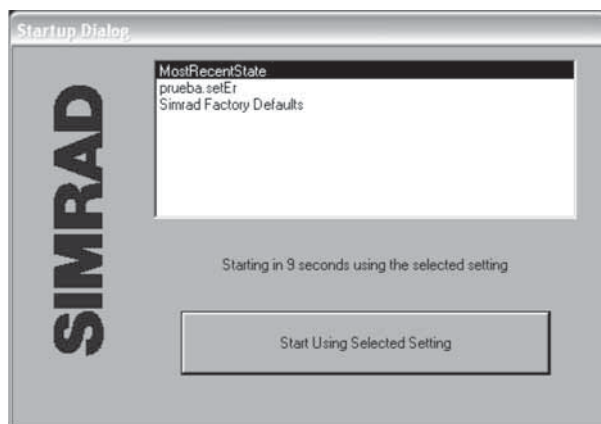


Figura 2. Ventana de perfiles de configuración.

Por defecto al inicio del programa aplica la configuración del sistema establecida con anterioridad (“MostRecentState”) por lo que, sin mover la opción de selección, se pulsa sobre el botón “Start using Selected Setting” y se abrirá la ventana de ejecución de programa.

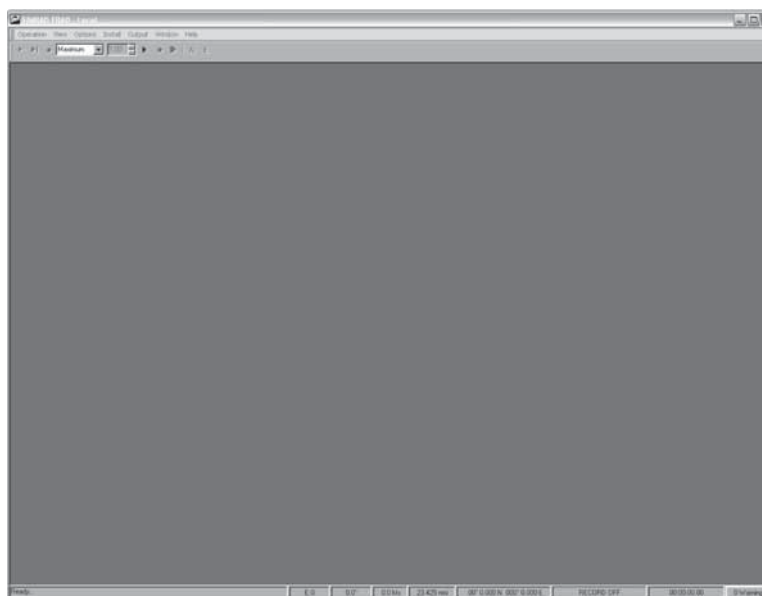


Figura 3. Ventana ejecución de ER60.

Pulsamos sobre el menú “Operation” y seleccionamos la opción “Normal”.

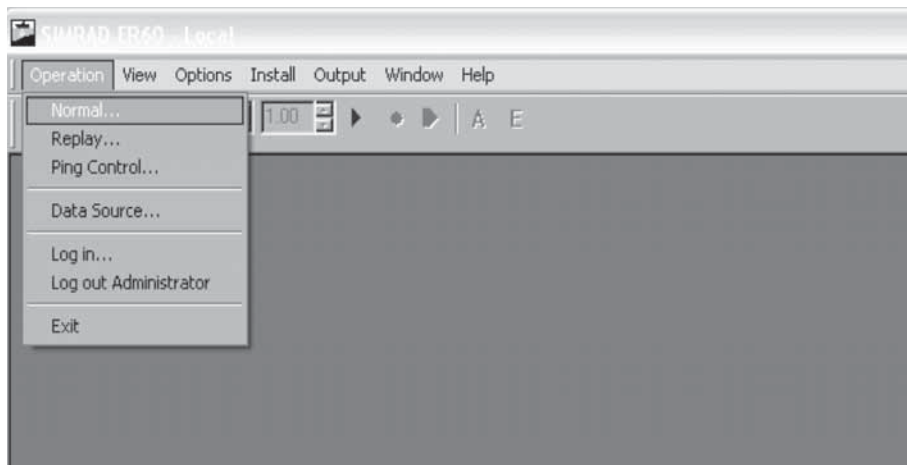


Figura 4. Menú “operation”.

Se abre la siguiente ventana donde aparecen los canales que tenemos activos, es decir, las sondas conectadas al ordenador, y nos aseguramos que aparezcan los siguientes parámetros:

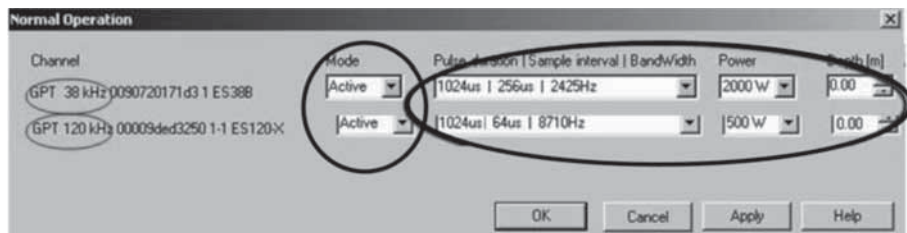


Figura 5. Parámetros “Normal Operation”.

En la casilla de “Mode”, aparece la palabra “Active” en todos los canales. En la parte donde pone “Pulse duration\Sample interval\Bandwidth” tiene que aparecer para todas las frecuencias el mismo valor de “Pulse Duration”, 1024us, que es el primer valor de la fila, si no fuera así habría que seleccionarlo de la siguiente manera:

Pinchamos sobre la opción desplegable de la casilla y aparecen todos los pulsos posibles, seleccionamos el que es de nuestro interés.



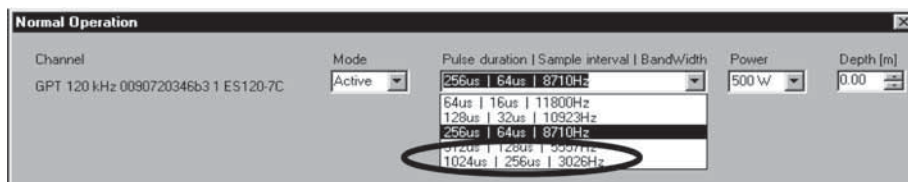


Figura 6. Selección de pulso.

En la opción de “Power” se selecciona una potencia para cada sonda.

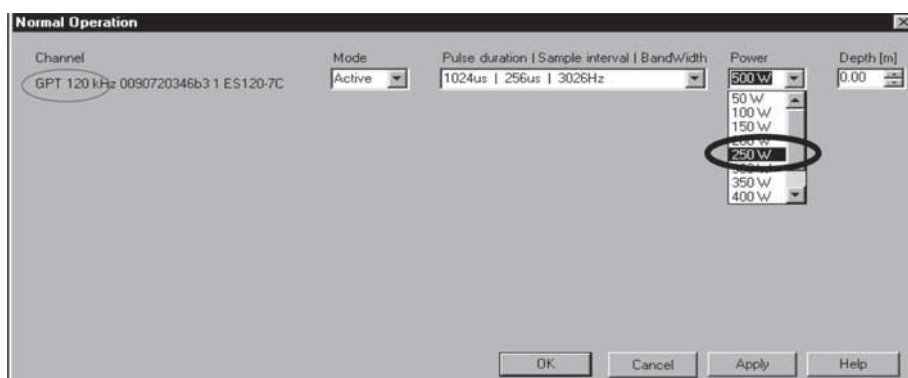


Figura 7. Selección de potencia para cada frecuencia.

TABLA RESUMEN. Configuración Sondas

Frecuencia sonda EK60	Pulse Duration	Power (*)
38 Khz.	1024 us	2500 W
120 Khz.	1024 us	250 W

En la opción de “Depth (m)” se pone la profundidad a la que se encuentra la sonda, generalmente como está colocada al casco del barco, esta sería la profundidad de calado del barco aproximadamente.

Una vez asegurados todos los parámetros con la configuración deseada se pulsa “Apply”, y finalmente “Ok”.

(\*) Criterios establecidos según el artículo: “Proposals for the collection of multifrequency acoustic data”, en Rolf J. Korneliussen, Noel Diner, Egil Ona, Laurent Berger y Paul G. Fernandes. *ICES J. Mar. Sci.* (2008) 65 (6): 982-994. doi: 10.1093/icesjms/fsn052. First published online: April 14, 2008.

Aparece la siguiente pantalla:

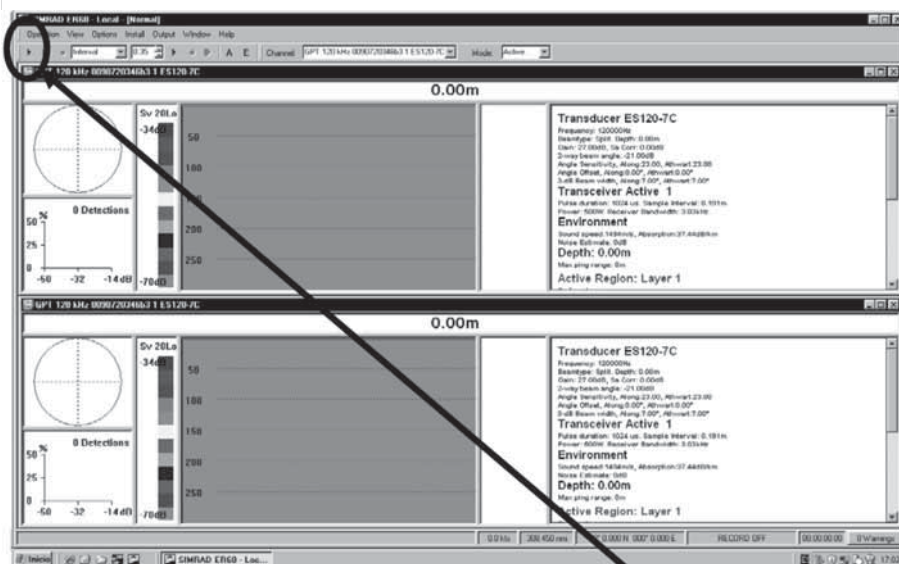


Figura 8. Ecogramas

Para el comienzo del registro se pulsa sobre el icono de play ►, que pasa a ser de color gris.

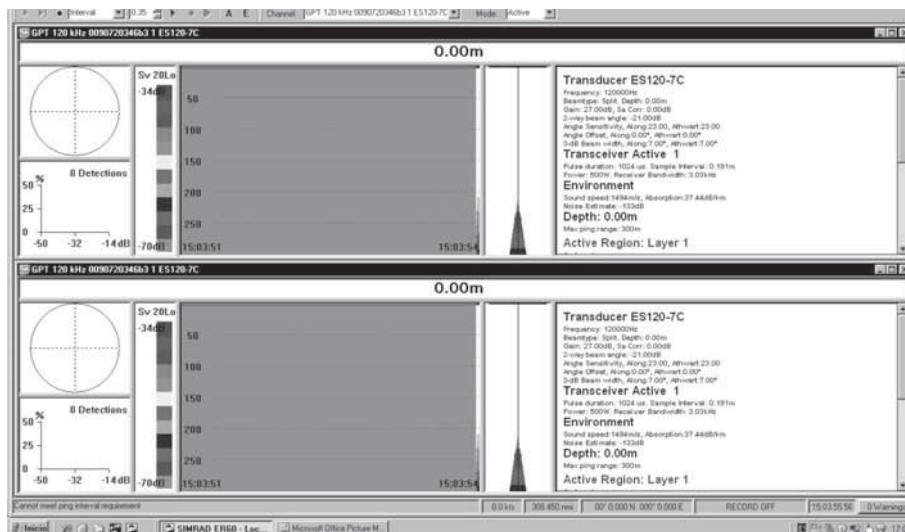


Figura 9. Comienzo de emisión acústica.

Antes de grabar los registros acústicos hay que establecer el directorio donde los guarda, para ello seleccionamos el menú “Output” y “File”.

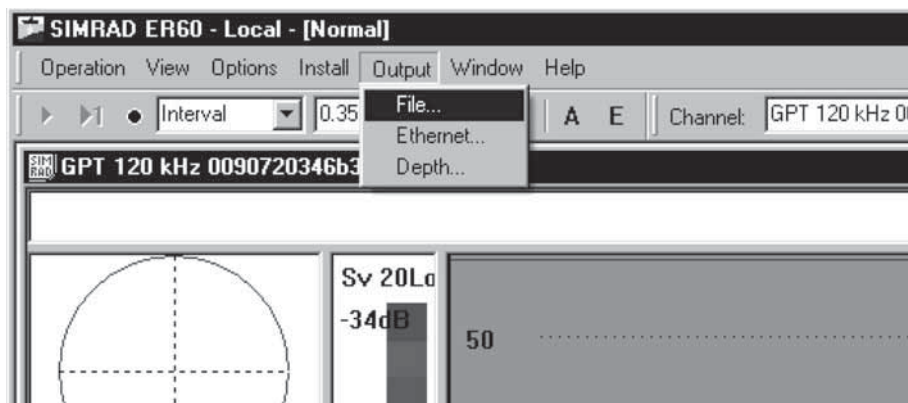


Figura 10. Cambio de directorio donde guarda los registros acústicos.

Pulsando la opción “Browse” seleccionamos nuestro directorio y aplicamos y aceptamos la corrección.

El siguiente paso es establecer el “Ping Rate”. El “Ping Rate” es el tiempo que transcurre entre dos emisiones (Pings) consecutivos.

Como se necesita una cobertura de profundidad alta, para establecer el “Deep Scattering Layer” necesitamos que la señal sonora alcance mucha profundidad. En la parte superior de la pantalla aparecen unas casillas establecidas para asignar el “Ping Rate”.

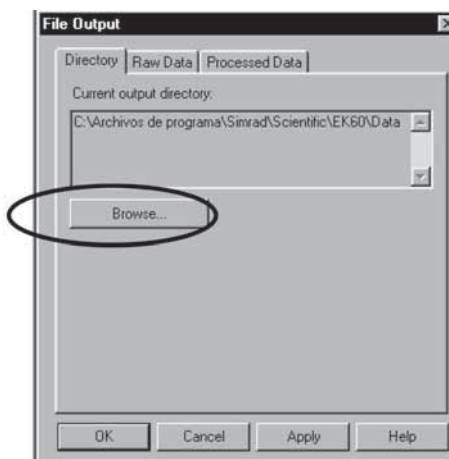


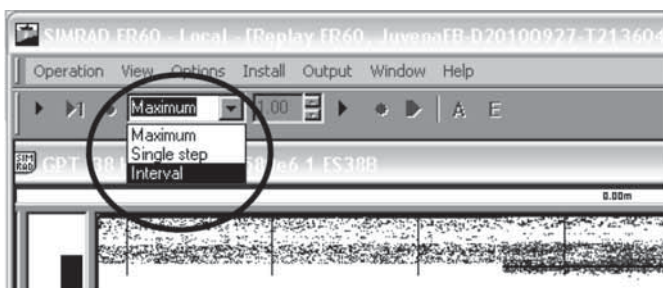
Figura 11. Cambio de directorio donde guarda los registros acústicos.



Tiene que estar de la siguiente manera:



Si no aparece esta configuración, se pulsa sobre el desplegable y se selecciona la opción “interval”, y entonces se establece el tiempo en la casilla de la derecha.



Se quiere alcanzar los 2000 m, por lo tanto estableceremos este “Ping Rate” en 2.3 milisegundos.



Seguidamente procedemos a grabar los registros acústicos pulsando sobre el icono de grabación ▶.

Se observa que la grabación ha comenzado porque el icono de grabación pasa a color gris y en la barra de información de estado aparece en Rojo las palabras “RECORD ON”.

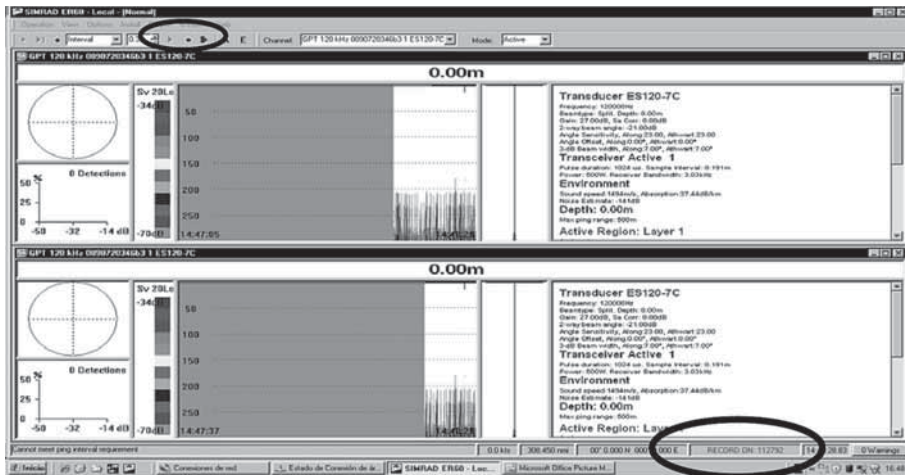





Figura 12. Inicio grabación datos acústicos.

Cuando finalice la etapa de la expedición, el proceso es a la inversa, primero se deja de grabar pulsando sobre el icono de fin grabación , las palabras RECORD ON, pasan a OFF y en color negro, y habría que guardar todos los registros guardados en una única carpeta identificando el nombre de la etapa a la que pertenecen.

Para parar la sonda se pulsa sobre el icono fin de emisión  y el icono play  vuelve a ponerse en color negro, y la imagen se queda fija, es entonces cuando podemos proceder al cerrado del programa pulsando en el menú “operation” y “Exit”.

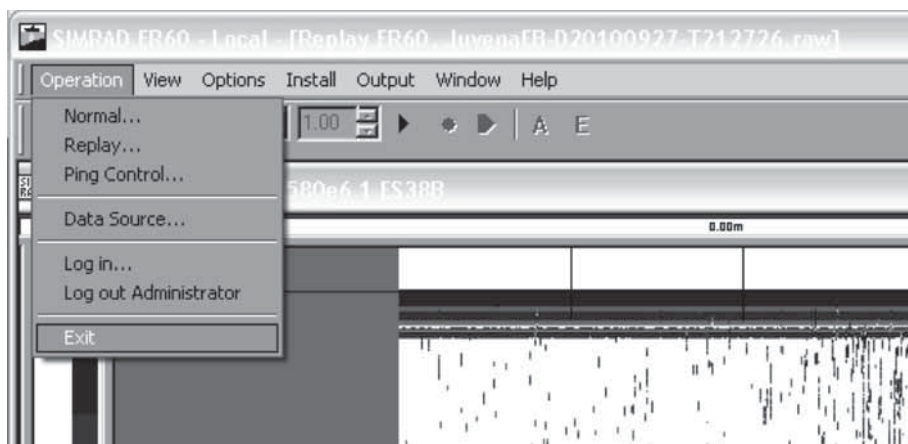


Figura 13. Menú “operation”, “Exit”, para cerrar la aplicación.

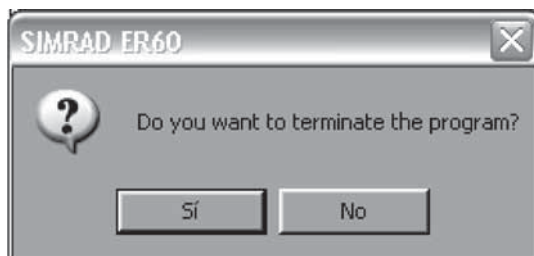


Figura 14. Terminar para cerrar la aplicación.

### Deep Scattering Layer

**Resumen del procedimiento:** visualizar en las sondas el “Deep Scattering Layer (DSL)” para poder llegar con el muestreo a la zona de interés.

#### *Procedimiento de actuación:*

Diariamente, para establecer la profundidad del Deep Scattering Layer (DSL) hay que observar en la sonda de 38 Khz. La señal producida por la fauna profunda se representa como una marca constante (Figura 16).

Por cada frecuencia hay una visualización donde se representa la respuesta de la sonda a la columna de agua. Para identificar qué visualización corresponde a qué sonda hay que fijarse en la parte superior de la misma.



Figura 15. Identificar las visualizaciones de cada sonda

El DSL se observa como una señal constante en una misma profundidad, algo parecido a la Figura 16.

Para ver la capa de DSL, hay que tener en la visualización la columna completa de muestreo, que en este caso alcanzara los 2000 metros. Para ello, hay que aplicarle un rango de visualización.

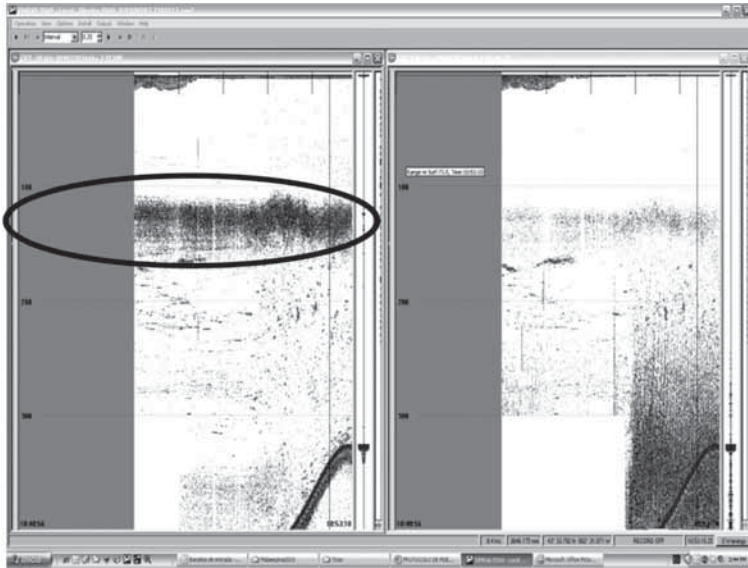


Figura 16: identificar el DSL en la frecuencia de 38 Khz

En la pantalla de dentro de la visualización de la frecuencia seleccionada (sonda de 38 Khz) se pulsa el botón derecho y parece un menú donde escogeremos la opción de “Range”.

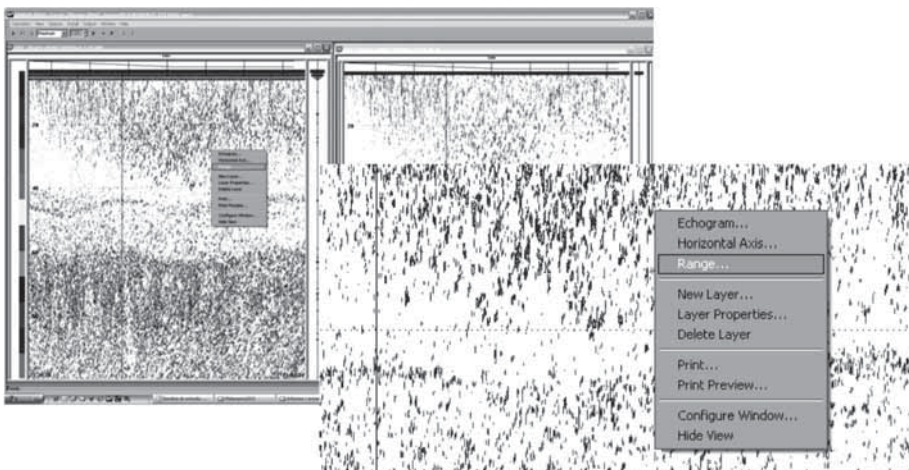


Figura 17. Menú botón derecho sobre la visualización de 38 Khz.



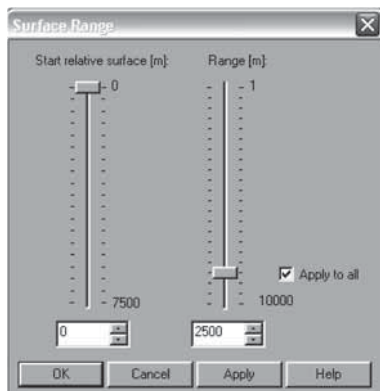


Figura 18. Selección del rango de visualización.

se aplicará a todas las visualizaciones por igual. Pulsamos “Apply” y luego “OK” y el menú desaparece.

Para saber a qué profundidad exactamente se encuentra el DSL, simplemente con acercar el cursor del ratón a la zona donde apreciamos el DSL aparece una línea escrita con la información de profundidad (Range re Surf), hora (Time), milla muestreada (Dist) y respuesta en Db (val). El valor de la profundidad donde se encuentra este DSL es el “Range re Surf” que en la figura 20 sería 131.3 m.

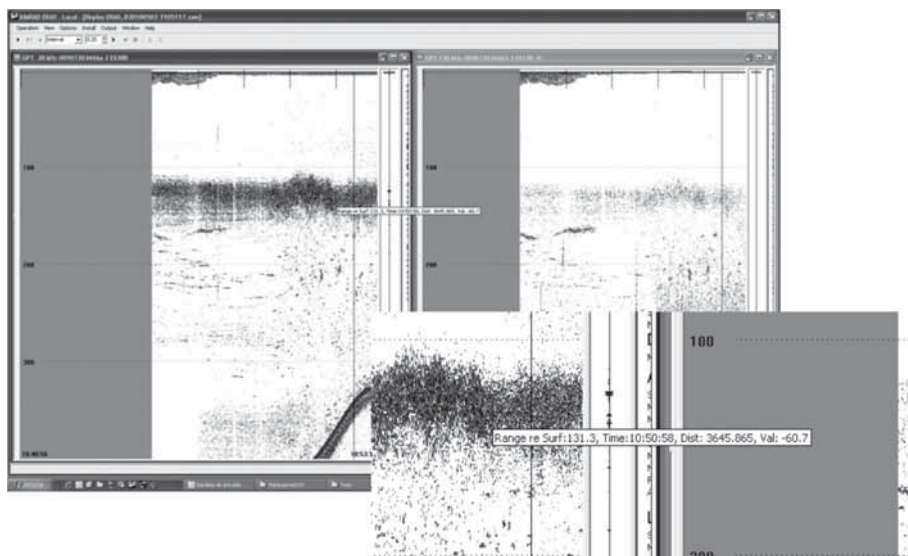


Figura 19. Valor del ping donde se encuentra el cursor.



Si por el contrario se prefiere una escala a la profundidad específica, en la parte izquierda del ecograma se visualiza la escala de la columna en metros.

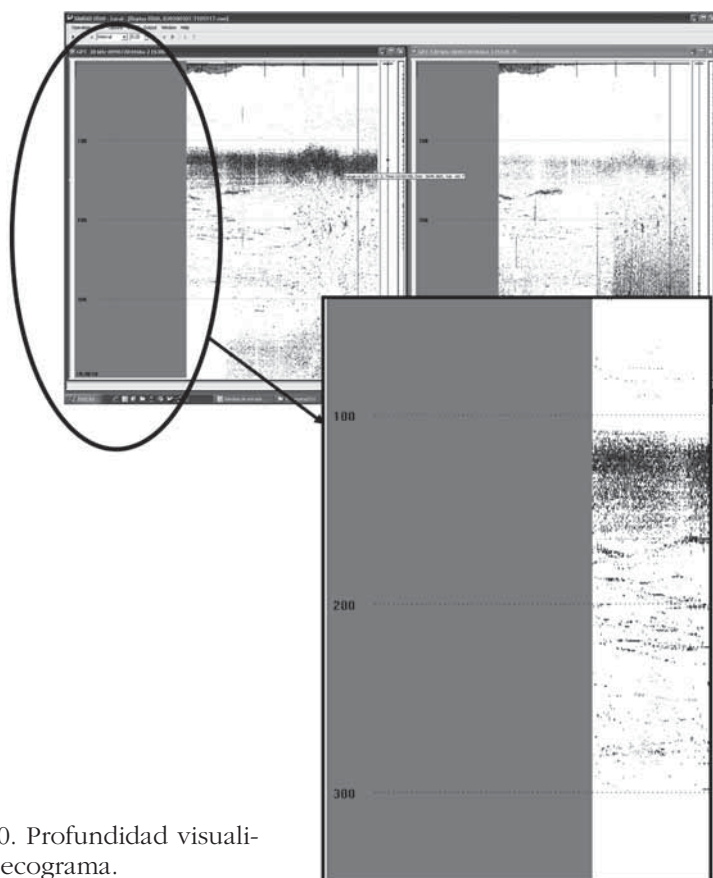


Figura 20. Profundidad visualizada en ecograma.

### Cambios en salinidad y temperatura

Resumen del procedimiento: anotar cambios de salinidad y temperatura de forma sistemática en la sonda para corregir el factor de absorción.

#### *Procedimiento de actuación:*

Tras un lance de CTD se obtienen los valores de temperatura y salinidad medios de la columna de agua, y se anota en el *software* de la sonda (ER60) y estadillo.

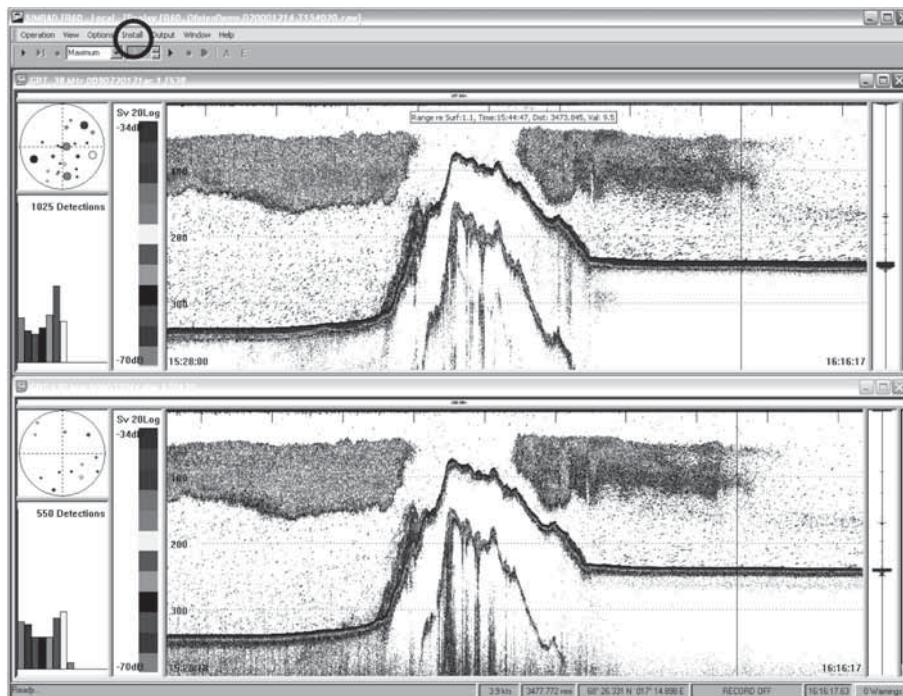


Figura 21. *Software* en adquisición de datos

En el menú principal pulsar sobre “Install” y pulsar la opción “Environment” (Figura 22).

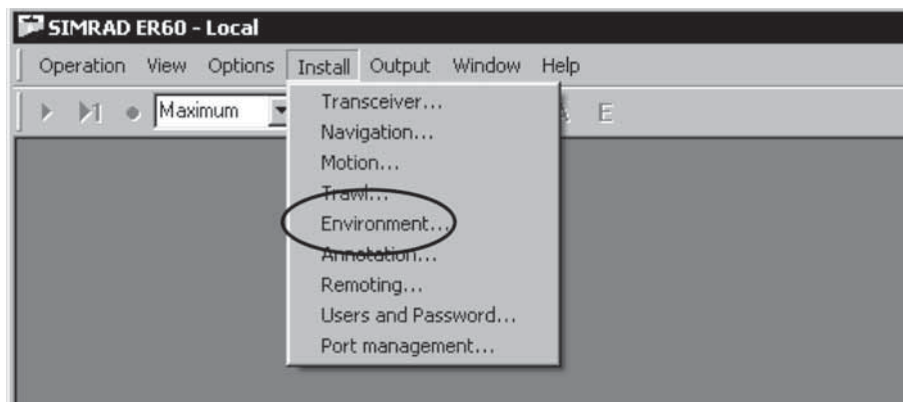


Figura 22. Cambiar parámetros de temperatura y salinidad en menú Environment.

Se abre la siguiente ventana (Figura 23), donde introducimos los valores medios de Temperatura y Salinidad para la columna de agua, aplicamos y pulsamos OK.

Automáticamente recalcula la velocidad del sonido y modifica el valor de la absorción para cada frecuencia.

Para diferenciar el cambio de parámetros hay que crear un nuevo fichero a partir del cambio, para ello se pulsa sobre la opción crear nuevo fichero (Figuras 24 y 25).

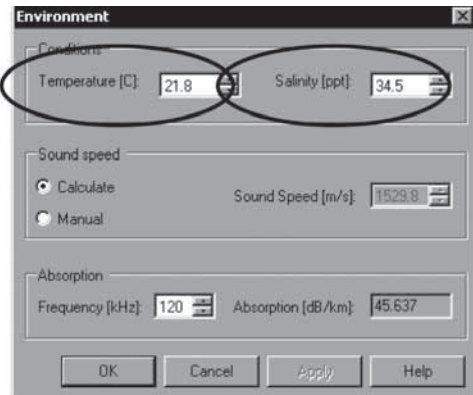


Figura 23. Menú Environment.

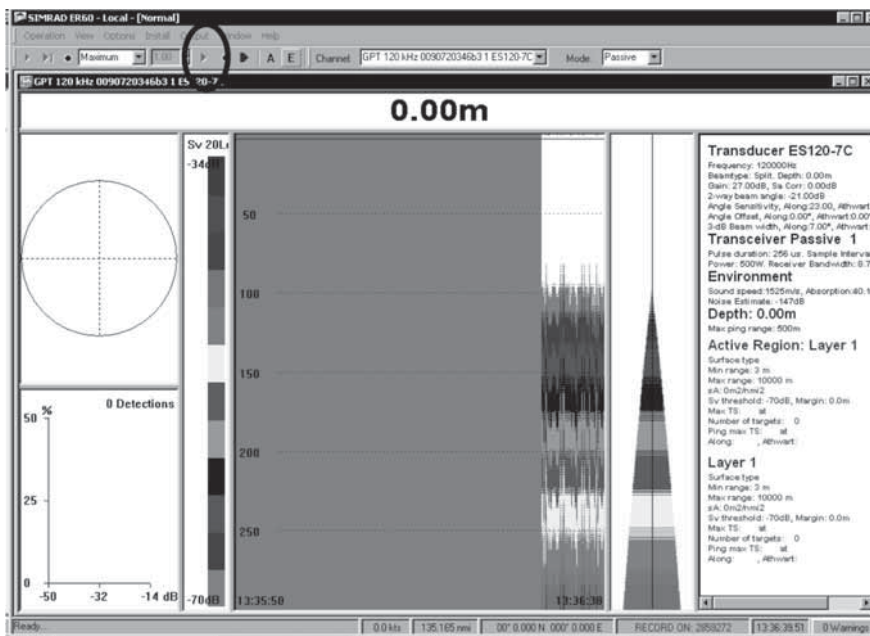


Figura 24. Pantalla principal de adquisición.



Figura 25. Barra de comandos crear nuevo fichero de grabación.

Para crear una anotación en el ecograma se pulsa sobre la letra “A” (Figura 26) y se abre un menú (Figura 27) donde anotamos “cambio parámetros ambientales”, pulsamos “OK” y en el ecograma aparece la anotación (Figura 28).



Figura 26. Barra de comandos crear una anotación.

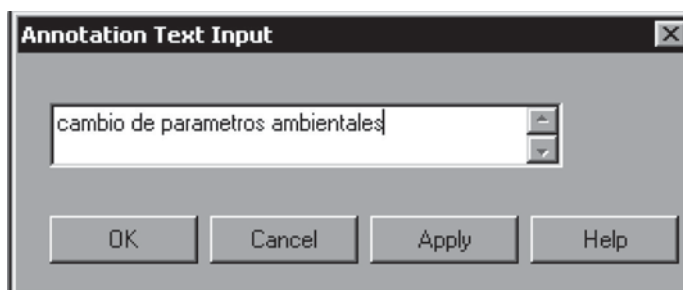


Figura 27. Menú anotación.

La anotación aparece representada en el ecograma de la siguiente manera:

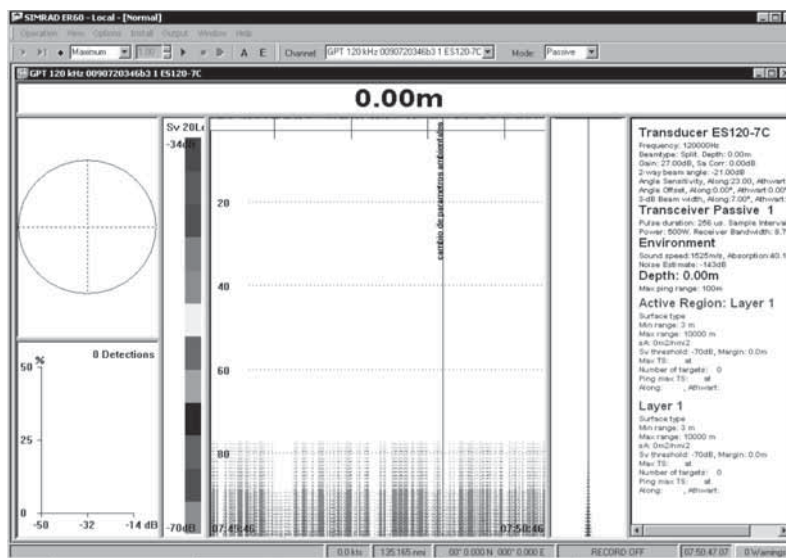


Figura 28. Anotación en el ecograma.

# Muestreo de fitoplancton para extracción de PUA (aldehídos volátiles poliinsaturados)

Arandia, N.; González-Gordillo, J. I.; Bartual, A.

*CACYTMAR, Universidad de Cádiz*

## Finalidad. Campo de aplicación

Metodología para obtener muestras de fitoplancton para posterior extracción, caracterización y cuantificación de Aldehídos volátiles insaturados.

## Conceptos generales

Las diatomeas constituyen un grupo fundamental en las cadenas tróficas marinas tradicionalmente explotadas, protagonizando grandes proliferaciones o *blooms* en una escala espaciotemporal previsible y asociada a un aumento en la disponibilidad de nutrientes. Durante la última década, numerosos trabajos se han centrado en el estudio de un tipo de compuesto de carácter alelopático liberado por diatomeas. Se trata de aldehídos volátiles poliinsaturados (PUA), eminentemente decadienal y octadienal, que son liberados ante la presión de herbivoría, y por tanto tras un daño celular. De ahí, que una de las funciones atribuidas a este tipo de compuestos sea defensiva, por su toxicidad para el zooplankton consumidor, principalmente copépodos. Este hecho constituye hoy día un punto de discusión importante, especialmente cuando se trata de evaluar las implicaciones tróficas así como el significado ecológico de estas sustancias. Un segundo papel que se ha atribuido a estas sustancias es de señal infoquímica intercelular, pudiendo actuar como reguladoras en la sucesión y colapso de un *bloom*. Poco se sabe, sin embargo, del efecto que las condiciones ambientales, muy cambiantes en el desarrollo de un *bloom*, puedan tener en el

proceso de síntesis de precursores de estos PUA, e incluso, se desconoce si pueden inducir o regular de algún modo su liberación. No se pueden descartar, además, otros efectos de interés ecológico, como la ventaja competitiva de las especies productoras frente a las no productoras ante el ataque de un consumidor. Además, prácticamente no se conoce qué cantidad de estos PUA existen en el medio natural, tanto en episodios de *bloom* como en entornos propicios para las diatomeas.

## Equipamiento necesario

Termosalinómetro continuo del barco.

## Descripción de la técnica

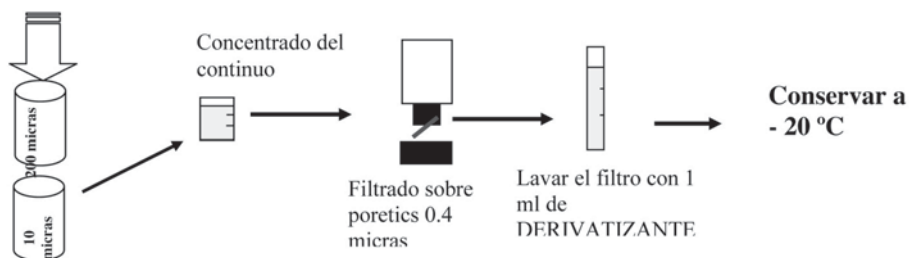
### *Toma de muestras*

1. Medir el flujo (l/min) del termosalinómetro continuo del barco y apuntarlo en el estadillo.
2. Al llegar al punto de muestreo (apuntar fecha, hora y estación con coordenadas en el estadillo) filtrar un volumen mínimo de 50 l por mallas consecutivas de 200 micras y 10 micras.
3. Apuntar en el estadillo tiempo de filtrado del continuo sobre malla de 10 micras (nos permitirá deducir el volumen total empleado).
4. Concentrar el fitoplancton acumulado en la malla de 10 micras en un vaso de precipitados.
5. Filtrar el contenido del vaso sobre filtro poretics de 0.4 micras.
6. Lavar el filtro sobre vial de vidrio etiquetado con *1 ml de DERIVATIZANTE* (0 - (2, 3, 4, 5, 6, - Pentafluorobencil) hidroxilamina (PFBHA-HCl) en 100 nM de Tris-HCl a pH: 7.0) usando pipeta automática y punta azul. El filtro puede colocarse en la pared vertical del tubo y verter el derivatizante sobre este, de forma que la solución vaya arrastrando las células de fitoplancton del filtro. *Si se usaran varios filtros para la misma muestra porque estuviera muy concentrada y tardara mucho en filtrar, tener la precaución de lavar el segundo, tercer... filtro con el mismo ml de reactivo y sobre el mismo vial en el que se lavó el primer l filtro. El volumen final de cada muestra en el vial debe ser SIEMPRE de 1 ml.*
7. Congelar inmediatamente la muestra.
8. Repetir todo el proceso con una segunda una segunda réplica.
9. Volver a medir el flujo del continuo y apuntar en estadillo.
10. Lavar todo el material con agua filtrada o, preferiblemente, con agua dulce.

*Estadillo de datos*

MUESTRAS PUA PROYECTO .....							
FLUJO DEL CONTINUO:						Fecha y hora	L/min.
FECHA	HORA GMT	ESTACION	PROF.	MALLA ZP USADA	MALLA FITO	VOLUMEN CONCENTRADO (TIEMPO DEL CONTINUO)	Nº VIAL PUA

## Cuadro sinóptico de la técnica



## Reactivos y material de laboratorio

## Conservantes:

- DISOLUCION 25 mM de o-(2,3,4,5,6,-Pentafluorobencil) hidroxilamina (PFBHA-HCl) en 100 mM de Tris-HCl a pH: 7.0.
- Mallas de 200 micras y 10 micras.
- 2 Columnas de filtración (de 25 mm).

- 2 Vasos de precipitados.
- 1 Timer.
- 100 Filtros de policarbonato poretics 0.4 micras-25 mm.
- 1 Pinza Millipore.
- DERIVATIZANTE en bote de topacio.
- Viales de vidrio para almacenamiento de muestras.

### Cálculo de los resultados

El cálculo del volumen concentrado se obtendría simplemente multiplicando el tiempo de filtrado del continuo por el flujo medio del continuo.

### Referencias

WICHARD, T., S. POULET, G. POHNERT. 2005. «Determination and quantification of a,b,d,g.unsaturated aldehydes as pentafluorobenzyl-oxime derivatives in diatom cultures and natural phytoplankton populations: application in marine field studies». *J. Chromatogr. B* 814: 155-161.



# Procesado de muestras de zooplancton para el análisis fisiológico y bioquímico de la respiración y excreción de amonio

Fernández-Urruzola, I.; Gómez, M.; Maldonado, F.; Osma, N.; Packard, T.

*Instituto de Oceanografía y Cambio Global*

## Finalidad. Campo de aplicación

Muestreo de zooplancton superficial (200 m) y análisis del metabolismo respiratorio y excretor en dos condiciones distintas: en el estado fisiológico natural (recién capturados) y en inanición (24 h sin alimento). Concretamente se pretende (I) Evaluar los procesos metabólicos de respiración aeróbica ( $RO_2$ ) y excreción de amonio ( $RNH_4^+$ ) en diversas tallas de zooplancton a lo largo de áreas oceánicas con distinta productividad y en dos condiciones fisiológicas distintas. (II) Relacionar dichas tasas con los sistemas enzimáticos implicados: Sistema de Transporte de Electrones (ETS) y Glutamato deshidrogenasa (GDH), respectivamente. (III) Determinar las concentraciones intracelulares de los sustratos que controlan las cinéticas Michaelianas de las reacciones bioquímicas correspondientes.

## Conceptos generales

La respiración del zooplancton tiene lugar en los océanos a escala planetaria. En el proceso se consume carbono orgánico para producir energía biológica necesaria, utilizándose oxígeno y liberándose finalmente  $CO_2$ , que acidifica el océano y puede liberarse hacia la atmósfera donde contribuye al calentamiento del planeta. Sin embargo, a pesar de la importancia de la respiración como componente clave en la estimación de los flujos de Carbono, su magnitud sigue siendo incierta (Del Giorgio y Duarte, 2002). Abordar el estudio del metabolismo respiratorio del zooplancton es, por

tanto, fundamental para conocer el carácter autotrófico o heterotrófico de los sistemas marinos.

Asimismo, la disponibilidad de nitrógeno (N) determina la productividad de los océanos y por tanto, la capacidad de este enorme ecosistema para actuar como sumidero del dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ) atmosférico. Como resultado, el N juega un papel crítico en los ciclos biogeoquímicos, de modo que su presencia va a incidir de forma directa en el balance trófico del sistema. La excreción heterotrófica de amonio ( $\text{NH}_4^+$ ) supone la mayor fuente de nitrógeno reciclado en la zona fótica (Harrison, 1987) y suple en torno al 80% de los requerimientos fitoplanctónicos (Harrison, 1992), reflejando la importancia de este proceso metabólico a escala global. Sin embargo, la eficiencia del reciclaje de  $\text{NH}_4^+$  varía desde el 50% en zonas costeras hasta el 95% en aguas oligotróficas, de los que el mesozooplankton aporta entre un 12% y un 23% (Hernández-León et ál. 2008). Cuantificar este proceso fisiológico en los océanos es, por tanto, imprescindible para caracterizar la eficiencia del ciclo del N y comprender las bases de la productividad de un ecosistema acuático.

Con el fin de evaluar las tasas fisiológicas de los organismos, los oceanógrafos han usado medidas directas mediante las clásicas incubaciones en botellas. Sin embargo, artefactos derivados de la manipulación de los organismos, las altas densidades a las que los individuos se ven expuestos o los episodios de inanición en periodos de incubación relativamente largos, reducen la fiabilidad de estas estimas (Bidigare, 1983). Además, tales medidas solo pueden llevarse a cabo a una baja resolución, a pesar de que la oceanografía requiere una elevada cantidad de estimas realizadas a grandes escalas de tiempo y espacio. En reconocimiento de esta necesidad, y a partir del conocimiento de la existencia de un vínculo entre los procesos fisiológicos de los organismos y los correspondientes mecanismos bioquímicos, surge la idea de utilizar la actividad de las enzimas responsables de estos procesos como índices para estimar tasas fisiológicas (Packard et ál., 1971; Bidigare y King, 1981; entre otros). Estos ensayos enzimáticos están diseñados para evaluar la velocidad máxima ( $V_{\text{max}}$ ) de una reacción dada, es decir, constituyen medidas potenciales que no tienen por qué corresponderse necesariamente con las tasas mostradas *in vivo*. La disponibilidad de los sustratos específicos de estas enzimas (piridín nucleótidos – PNs – y Glutamato) determinará, entre otros factores, la velocidad a la que tiene lugar la reacción. Un seguimiento de su concentración podría proporcionar un modelo de predicción de dichas tasas fisiológicas basado en los principios fundamentales (Packard y Gómez, 2008).

Un mayor conocimiento de la relación entre las actividades enzimáticas ETS y GDH y sus tasas metabólicas asociadas bajo distintas condiciones fisiológicas, conducirá a una interpretación más contundente de las variaciones mesoscalares en el consumo de  $\text{O}_2$  y excreción de  $\text{NH}_4^+$  del zooplankton.

## Equipamiento a bordo necesario

Baño termostático (con un intervalo de temperatura suficiente como para cubrir el rango encontrado en el medio natural), agitador magnético, incubador, oxímetro (Strakelvin Instruments, modelo 928), ordenador, espectrofluorómetro, N<sub>2</sub> líquido y congelador -80 °C.

## Reactivos u otro material fungible

### Reactivos:

- Agua de mar filtrada al menos por filtros de fibra de vidrio Whatman GF/F (0.2 µm).
- Agua desionizada ultrapura Milli-Q.
- O-phthalaldehído.
- Etanol.
- Tetraborato de disodio (BORAX).
- Sulfito de sodio anhidro.
- Cloruro de amonio.
- Ácido clorhídrico (al 5% con agua destilada).
- Ácido nítrico (al 30% con agua destilada).

### Otro material:

- Tamices plásticos con mallas de 100, 500 y 1000 µm.
- Tanques de plástico donde depositar los organismos después del tamizado.
- botellas de incubación (60 ml para medidas de metabolismo; 1000 ml para mantenimiento de los organismos).
- Tanque de plástico con cierre hermético.
- Matraces aforados.
- Botellas de polietileno.
- Pipetas: 5–100 µl; 200–1000 µl; 1000–5000 µl, y sus correspondientes puntas de plástico.
- Pipetas Pasteur.
- Sifón con malla de 100 µm en uno de sus extremos.
- Agitadores magnéticos.
- Tubos falcon (15 ml).
- Gradilla para tubos falcon.
- Cubetas de cuarzo (3 ml).
- Bomba de aire y aireadores.
- Cajas criogénicas.
- Crioviales.
- Guantes de látex o vinilo (sin talco).
- Frasco lavador.
- Termómetro.

- Cronómetro.
- Papel absorbente.
- Estadillo.

## Calibración

Las medidas de respiración precisas requieren la correcta calibración del oxímetro, proceso que debe repetirse al menos una vez por semana. Para ello deben tomarse dos vasos de precipitados, donde poder poner verticalmente los 6 electrodos. Añadir preferiblemente agua destilada, de tal forma que el extremo de cada electrodo quede sumergido. En uno de los vasos se debe agregar sulfito de sodio (anhidro) hasta saturación, de modo que se elimine todo el oxígeno disuelto. Calibramos el punto de mínimo de oxígeno, cuidando que el amperaje resultante no supere los 10 pA y la concentración de oxígeno no varíe más de  $\pm 0.4$ . Se lavan los electrodos y se sumergen ahora en un vaso de precipitado con agua destilada cuya concentración de oxígeno disuelto se sitúa en el nivel de saturación. El cálculo de este valor requiere conocer previamente la temperatura del agua y la presión atmosférica en ese momento dado. En este caso, el amperaje medido no debería superar los 600 pA.

Respecto a las medidas de excreción de amonio, es importante acotar el rango de las concentraciones de  $\text{NH}_4^+$  en el que nos vamos a encontrar por unidad de tiempo, ya que el protocolo a seguir variará en función de dicha concentración. Por este motivo, durante los primeros muestreos debe hacerse una aproximación del valor esperado en función del tipo de organismos y cantidad de biomasa encontrada en un área concreto. Las concentraciones de amonio excretado por unidad de tiempo se obtiene a partir de la extrapolación de los resultados en la curva de calibrado que usa el Cloruro de Amonio como patrón. Es interesante comprobar de vez en cuando que el equipo espectrofluorimétrico está calibrado, de tal modo que los picos de excitación (sin muestra) y emisión (con agua MiliQ) deberían encontrarse en 467 nm y 390 nm respectivamente.

En ambos casos es importante tener bien calculado el volumen de agua de mar que cabe en cada botella. Para ello se pesan las botellas secas y sin tapón. Las rellenamos con agua destilada e introducimos el electrodo que corresponda para que desplace un volumen de agua dado. Sacamos el electrodo, secamos la botella y pesamos. La diferencia entre el peso final menos el peso inicial, nos da el volumen de agua que ocupa cada botella (1 gr.  $\text{H}_2\text{O}$  destilada = 1 ml.). Para evitar variaciones, cada electrodo debe ser específico de una botella dada durante toda la campaña, por lo que es conveniente rotular tanto el electrodo como la botella.

## Descripción de la técnica

Las muestras a procesar procederán de pescas verticales realizadas con una red de 100  $\mu\text{m}$  en los primeros 200 m de la columna de agua. El colector asociado a la red tiene un volumen de agua igual a 0.6 l.

### *Procesado de muestras recién capturadas*

No lavar la red con ninguna manguera de agua marina mientras está en el cable con el colector. Desmontar y llevar al interior del laboratorio con cuidado que no se vuelque el colector.

El contenido del colector se tamiza con el fin de dividir la muestra en las tallas 100-500  $\mu\text{m}$ , 500-1000  $\mu\text{m}$  y >1000  $\mu\text{m}$ . La fracción obtenida en cada tamiz se vierte con cuidado a un pequeño contenedor plástico previamente contiene agua de mar filtrada. Tan pronto como sea posible debe introducirse la primera talla a analizar en las botellas de incubación (60 ml), evitando aquellos organismos en mal estado o muy estresados. El resto de la muestra debe situarse en botellas de borosilicato (1 l), una por cada talla. Es importante desechar previamente, en la medida de lo posible, todos aquellos animales típicamente carnívoros (quetognatos, por ejemplo). Estas botellas, mantenidas de forma constante con aireación, se incuban 24 h sumergidas en un tanque con agua recirculando a la misma temperatura que aquella registrada en el medio natural.

### *Medidas del metabolismo: consumo $\text{O}_2$ y excreción de $\text{NH}_4^+$*

Se considera un estado fisiológico natural cuando se llevan a cabo las medidas metabólicas en las primeras 4 horas tras la captura, tiempo a partir del cual se puede asumir el comienzo de un estado de inanición cuyo efecto sobre las tasas metabólicas es máximo a partir de las 12 h (Mayzaud, 1976). En este periodo de tiempo, cada talla debe dividirse sucesivamente en 5 submuestras que serán analizadas en botellas de 60 ml a lo largo de una hora de incubación. Una sexta botella actuará como blanco, de modo que no contendrá ningún individuo. Antes de introducir los organismos, las botellas deben estar parcialmente llenas con el agua de mar filtrada. A continuación dispondremos las botellas en una cámara de metacrilato conectada a un baño termostático, donde la recirculación de agua en su interior permitirá estabilizar la temperatura de las botellas, e igualarla a la registrada en el medio. La manipulación de los organismos debe ser lo más delicada posible con el fin de evitar un excesivo estrés que distorsione su metabolismo.

**Consumo  $\text{O}_2$ .** Una vez los organismos están alojados en el interior de las botellas, se introducen los electrodos con cuidado, asegurándose de no dejar ningún tipo de burbujas en la botella. A continuación se oscurece el

sistema con el fin de minimizar procesos biológicos que puedan interferir en las medidas. Cada botella es agitada magnéticamente con el fin de impedir la formación de un gradiente de oxígeno desde la base hasta el extremo del electrodo. Transcurrida la hora de incubación, se guardan las tasas de consumo de oxígeno registradas, se toman las muestras para el análisis de amonio y se depositan los organismos en crioviales que serán inmediatamente congelados en N líquido (-196 °C) para su posterior almacenaje a -80 °C. Es importante no exponer las muestras a una temperatura inferior a -80 °C antes de su análisis en el laboratorio, ya que de otra forma se perdería actividad enzimática por degradación proteica.

**Excreción de  $\text{NH}_4^+$ .** Se estima en las mismas botellas de incubación que se usan para el estudio del metabolismo respiratorio. Antes de comenzar la incubación, deben tomarse tres muestras de 10 ml de la misma agua de mar filtrada en la que los individuos se van a incubar. Transcurrida la hora de experimentación, se toma una nueva muestra de agua (10 ml) de cada botella mediante el sifonado con un tubo que tiene en su extremo una malla de 100  $\mu\text{m}$ . El procedimiento a seguir con las muestras es el mismo que el detallado por el protocolo de Holmes et ál. (1999), añadiendo a cada tubo 4 ml del reactivo especificado. La tasa de excreción de  $\text{NH}_4^+$  vendrá dada por la diferencia entre las medidas finales de concentración de  $\text{NH}_4^+$  (resultado que proviene de restar el valor de  $\text{NH}_4^+$  de las botellas control, a las botellas experimentales) y las medidas iniciales, estandarizado por el tiempo transcurrido.

### *Medidas de las actividades enzimáticas: ETS y GDH (en laboratorio)*

Los análisis de la actividad enzimática del ETS se llevarán a cabo en el laboratorio de acuerdo con la técnica descrita por Packard et ál. (1971), modificada por Owens y King (1975) y Gómez et ál. (1996). Para la actividad de la GDH se utilizará la metodología propuesta por Bidigare y King (1981).

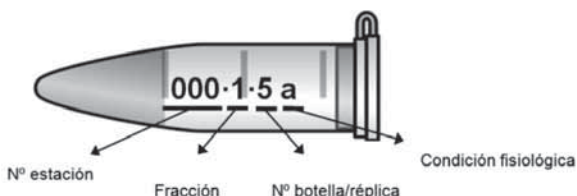
### *Medidas de las concentraciones intracelulares de los sustratos implicados (en laboratorio)*

Las concentraciones intracelulares de PNs se determinarán en el laboratorio siguiendo una modificación de la metodología descrita por Wagner y Scott (1994). La concentración intracelular de glutamato se medirá mediante el correspondiente kit de ensayo (BioVision).

### *Medidas de la biomasa proteica (en laboratorio)*

Una vez realizados los ensayos enzimáticos se estimará la biomasa de las muestras mediante el análisis de proteínas utilizando el método de Lowry (1951), modificado por Rutter (1967).

**Nomenclatura de los crioviales almacenados:** Cada criovial debe ser perfectamente rotulado con un rotulador permanente tanto en cuerpo como en tapa. La nomenclatura utilizada debe seguir las siguientes reglas:



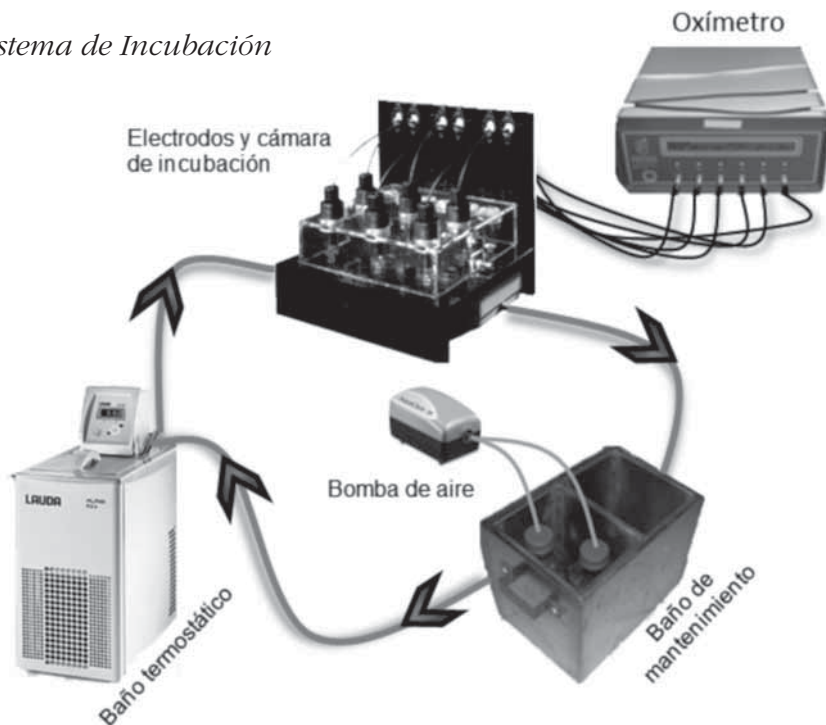
### *Estadillo de datos*

Se recomienda un modelo de estadillo que contenga los siguientes campos: Estación, Hora, Latitud, Longitud, Estado del mar, Cond. Atmosféricas (Viento, Nubes, Profundidad, CTD (Temp., Chl *a*), Observaciones.

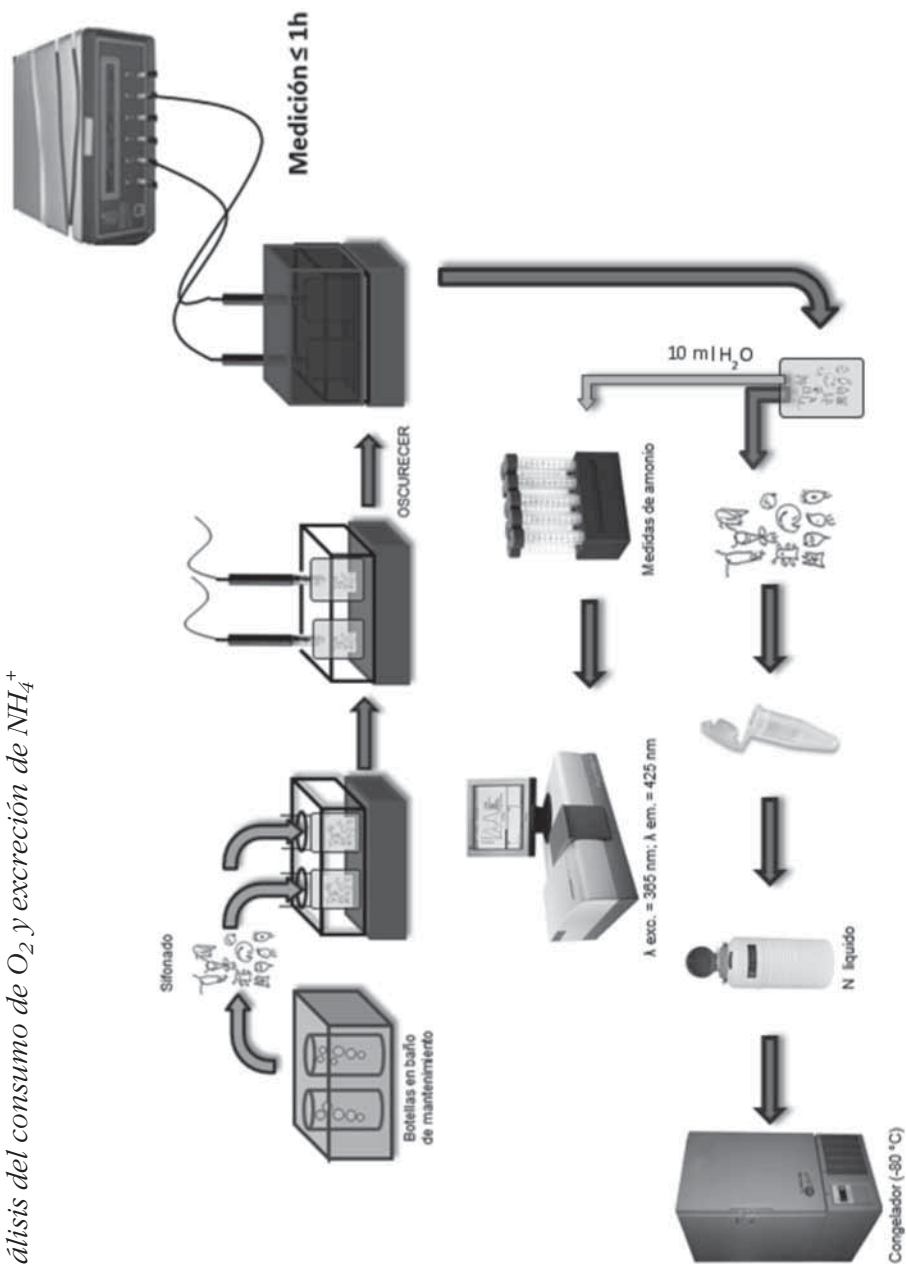
Para tasas metabólicas se recomienda anotar datos de Talla, Hora<sub>i</sub> (local), Electrodo/channel, No. Botella, Vol. / Nº muestra, Código muestra, Hora<sub>0</sub> incubación, Tiempo de incubación, Hora adición reactivos, Tpo. incubación con WR, Observaciones.

### **Cuadro sinóptico de la técnica**

#### ➤ *Sistema de Incubación*



➤ *Análisis del consumo de  $O_2$  y excreción de  $NH_4^+$*





## Cálculo de los resultados

Durante la campaña puede calcularse la tasa de respiración de  $O_2$  a partir de los datos registrados en el ordenador. Para ello tomaremos la mayor fracción de tiempo en que el consumo de  $O_2$  se mantiene lineal y estable. Debido al estrés generado por la manipulación de los organismos, los primeros minutos de la incubación no suelen tomarse en cuenta.

Una vez conocida la variación de la concentración de  $O_2$  en un tiempo dado ( $\text{mol } O_2 \cdot \text{ml}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ ) debe estandarizarse por el volumen total en que se incubó cada muestra y por la unidad de biomasa conformada por la totalidad de los individuos de la muestra.

La tasa de excreción de amonio se calcula de forma directa durante las medidas de las muestras en el espectrofluorímetro. Los resultados se introducen en una plantilla Excel donde los valores de fluorescencia final (diferencia entre los puntos finales y los iniciales, corregido por el efecto del blanco) se obtienen automáticamente de la recta patrón elaborada anteriormente. En este caso también es necesario estandarizar por unidad de volumen y de biomasa. Cada submuestra deberá ser leída por triplicado en el espectrofluorímetro, de modo que se trabajará con la media de las lecturas.

## Control de calidad

Los electrodos del oxímetro son muy sensibles, por lo que su manipulación debe ser cuidadosa. El electrolito de su interior debe ser reemplazado al menos cada 10 días. Si la señal que transmite el electrodo es inestable, puede ser debido al propio movimiento del barco o a impurezas asociadas al extremo del electrodo. Esto último puede solucionarse mediante una limpieza del mismo con acetona, que eliminará grasas y materia orgánica. A pesar de que no estén midiendo en un momento dado, los electrodos deben estar siempre en un ambiente húmedo.

La manipulación de las muestras de amonio debe ser cuidadosa, manteniendo absoluta limpieza tanto en el instrumental utilizado como en el lugar de trabajo. Es importante usar guantes al tomar las muestras debido a la facilidad de contaminación con otras fuentes de amonio. Por este motivo, es interesante evitar la presencia de fumadores e instrumentos que puedan generar este compuesto (ej., compresor de refrigeradores) en el entorno del experimento.

Una vez finalizado el experimento diario, debe lavarse todo el material (botellas, tubos falcon y puntas de pipeta de 5 ml) con HCl diluido al 5% con agua destilada.

## Otras técnicas similares

El consumo de  $O_2$  en el medio marino ha sido clásicamente abordado a partir de análisis químicos de la concentración de  $O_2$  disuelto. El método Win-

kler, y su variante más sensible, el micro-winkler, son dos técnicas contrastadas que siguen siendo utilizadas hoy en día en las campañas oceanográficas. Sin embargo, su limitación radica en que solo puede obtenerse valores discretos (iniciales y finales) de concentración de oxígeno. Este hecho impide comprobar el comportamiento que el consumo de  $O_2$  ha sufrido a lo largo del periodo de incubación, y por tanto, no puede saberse si el descenso registrado es o no lineal. Otras tecnologías más novedosas como los electrodos y los optodos, permiten monitorizar de forma continua la variación del  $O_2$  disuelto en el medio, razón por la que han sido utilizados en el presente estudio.

Respecto a las estimas de excreción de amonio, han sido muchas las técnicas que se han desarrollado durante las últimas décadas. Un método muy extendido es el del fenol-hipoclorito (Parson et ál. 1984). Sin embargo, la metodología aplicada en esta investigación consiste en una técnica más moderna propuesta por Aminot y K  rouel (1997) y modificada por Holmes et ál. (1999), la cual aumenta la sensibilidad de la detección de amonio mediante el uso de la fluorometría. Este hecho es importante teniendo en cuenta la escasa biomasa esperada en las tallas más pequeñas, y las incubaciones tan cortas con las que se van a trabajar. Además, es una técnica relativamente barata que no genera residuos tan contaminantes.

### El protocolo de estimación del metabolismo del zooplancton en imágenes



Foto 1. Red WP-2 (100  $\mu m$ ) utilizada en la recogida de muestras.

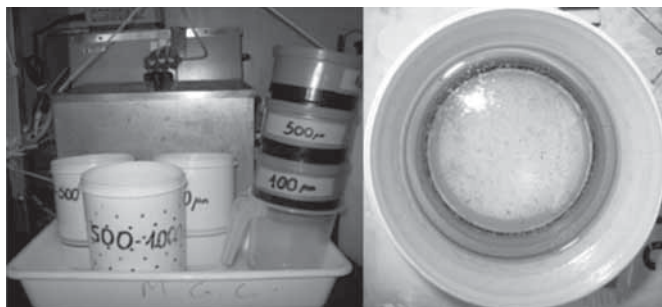


Foto 2. Izquierda: Sistema de tamizado de las distintas tallas. Derecha: Fracción ya tamizada y mantenida en agua de mar filtrada.



Foto 3. Izquierda: Incubación en botellas donde la concentración de  $O_2$  es monitorizada por un oxímetro. Abajo: Las pendientes de las muestras corregidas por las botellas control reflejan la tasa respiratoria de los organismos.

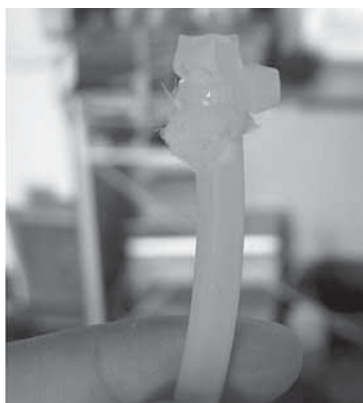


Foto 4. Sifón para extracción de  $NH_4^+$  con malla de  $100\ \mu m$  en el extremo.



Foto 5. Espectrofluorímetro para lecturas de muestras de amonio.

## Referencias

- BIDIGARE, R. R. 1983. «Nitrogen Excretion in Marine Zooplankton». En E. J. CARPENTER y D. G. CAPONE (eds.), *Nitrogen in the marine environment*, pp. 385-409.
- BIDIGARE, R. R., F. D. KING. 1981. «The measurement of glutamate dehydrogenase activity in *Praunus flexuosus* and its role in the regulation of ammonium excretion». *Comp. Biochem. Physiol.*, 70(B): 409-413.
- GIORGIO, P. A. D.; C.M. DUARTE. 2002. «Respiration in the open ocean». *Nature*, 420: 379-384.
- GÓMEZ, M., S. TORRES; S. HERNÁNDEZ-LEÓN. 1996. «Modification of the Electron Transport System (ETS) method for routine measurements of respiratory rates of zooplankton». *South African J. Mar. Sci.* 17: 15-20.
- HARRISON, W. G. 1992. «Regeneration of nutrients». En P. G. FALKOWSKI y A. D. WOODHEAD (eds.), *Primary Productivity and Biogeochemical Cycles in the Sea*, Plenum Press, pp. 385-409.
- HARRISON, W. G., T. PLATT; M. R. LEWIS. 1987. «f-Ratio and its relationship to ambient nitrate concentration in coastal waters». *J. Plank. Res.*, 9(1): 235-248.
- HERNÁNDEZ-LEÓN, S., C. FRAGA; T. IKEDA. 2008. «A global estimation of meso-zooplankton ammonium excretion in the open ocean». *J. Plank. Res.*, 30(5): 577-585.
- HOLMES, R. M., A. AMINOT, R. KÉROUEL, B. A. HOOKER; B. J. PETERSON. 1999. «A simple and precise method for measuring ammonium in marine and freshwater ecosystems». *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 56: 1801-1808.
- KÉROUEL, R., A. AMINOT. 1997. «Fluorometric determination of ammonia in sea and estuarine waters by direct segmented flow analysis». *Mar. Chem.*, 57: 265-275.
- LOWRY, O. H., N. J. ROSEBROUGH, A. L. FARR; R. J. RANDALL. 1951. «Protein measurement with the folin phenol reagent». *J. Biol. Chem.*, 193: 265-275.
- MAYZAUD, P., R. J. CONOVER. 1976. «Influence of potential food supply on the activity digestive enzymes of neritic zooplankton». *Proceedings 10<sup>th</sup> European Marine Biology Symposium*, 2: 415-427.
- OWENS, T. G., F. D. KING. 1975. «The measurement of respiratory electron transport system activity in marine zooplankton». *Mar. Biol.*, 30: 27-36.
- PACKARD, T. T., M. GÓMEZ. 2008. «Exploring a first-principles-based model for zooplankton respiration». *ICES J. Mar. Sci.*, 65(3): 371-378.
- PACKARD, T. T., M. L. HEALY, F. A. RICHARDS. 1971. «Vertical distribution of the activity of the respiratory electron transport system in marine plankton». *Limnol. Oceanogr.* 16: 60-70.
- PARSONS, T. R., Y. MAITA, C. M. LALLI. 1984. *A Manual of Chemical and Biological Methods for Seawater Analysis*. Pergamon Press, Oxford.
- RUTTER, W. J. 1967. «Methods in developmental biology». *Protein determinations in embryos*, pp. 671-684. Academic Press, London.
- WAGNER, T. C.; M. D. SCOTT. 1994. «Single extraction method for the spectrophotometric quantification of oxidized and reduced pyridine nucleotides in erythrocytes». *Anal. Biochem.*, 222: 417-426.

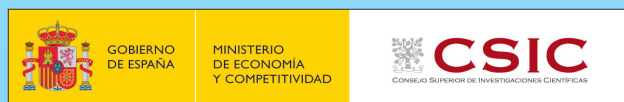






*Durante siete meses, el buque oceanográfico español Hespérides completó una vuelta al mundo ininterrumpida cruzando los océanos Atlántico, Índico y Pacífico en un trayecto que recaló en los puertos de Río de Janeiro, Ciudad del Cabo, Freemantle, Sidney, Auckland, Honolulu y Cartagena de Indias, para regresar posteriormente a Cartagena. En paralelo, el buque oceanográfico Sarmiento de Gamboa completó un estudio detallado del Atlántico subtropical a lo largo del paralelo 24° N, partiendo de Vigo a Las Palmas, y de allí a Santo Domingo para retornar a Vigo. Durante esta gesta histórica para las ciencias marinas españolas se muestrearon 350 estaciones en cerca de 42.000 millas náuticas a lo largo del océano global, se recogieron más de 120.000 muestras de agua, aire y plancton, y se registraron más de 6.000 gigas de datos, a partir de los cuales la Expedición Malaspina 2010 ha investigado en profundidad aspectos como la oceanografía física, la óptica oceánica, la biogeoquímica, el papel de la deposición atmosférica, la presencia de contaminantes, la biodiversidad y función microbiana, los procesos metabólicos y la estructura y función de las comunidades fitoplanctónicas y zooplanctónicas.*

*El presente Libro blanco supone una herramienta clave para plasmar un esfuerzo científico de este calibre y desarrollar una línea de investigación que evalúe el impacto del cambio global en el ecosistema oceánico. Se ha conformado así un manual actualizado e interdisciplinar que recoge los diferentes métodos, protocolos y técnicas de trabajo oceanográfico empleados, aplicados en todos los océanos y bajo todas las condiciones de trabajo imaginables durante la Expedición Malaspina 2010, proyecto financiado por el desaparecido Ministerio de Ciencia e Innovación a través del programa Consolider-ingenio 2010 y con una participación destacada de la Armada Española y de la Fundación BBVA.*



Fundación BBVA

