

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.)

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

PRÓLOGO	13
1. OCEANOGRAFÍA FÍSICA	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
2. BIOGEOQUÍMICA DEL OCÉANO: CARBONO, NUTRIENTES Y GASES TRAZA	77
– Muestreo y análisis de oxígeno disuelto (O ₂) 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 (¹³ C/ ¹² C) y nitrógeno (¹⁵ N/ ¹⁴ 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 $^{15}\text{NO}_3^-$, $^{15}\text{NH}_4^+$, ^{15}N -urea y fijación de $^{15}\text{N}_2$	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 $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ 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
3. CONTAMINANTES Y DEPOSICIÓN ATMOSFÉRICA	313
– 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
4. ÓPTICA, FITOPLANCTON Y METABOLISMO DEL OCÉANO	371
– 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 ^{18}O (GPP- ^{18}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 piceucariotas, 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 bacterio-plancton 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 ₂	565
– Estudio de la cuantificación de CID por el plancton procarionota mesopelágico (≥ 200 m)	575
– Actividad enzimática de los procarionotas planctónicos	579

ÍNDICE

11

– Estudio de la actividad del plancton procariota profundo (≥ 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
6. DISTRIBUCIÓN Y FUNCIÓN DEL ZOOPLANCTON EN EL OCÉANO	603
– 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 PUAs (aldehídos volátiles poliinsaturados)	673
– Procesado de muestras de zooplancton para el análisis fisiológico y bioquímico de la respiración y excreción de amonio	677



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

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

¹*Instituto de Investigaciones Mariñas (CSIC)*

²*Institut de Ciències del Mar (CSIC)*

³*Universidad de Granada*

⁴*Universidad de Vigo*

⁵*Instituto Mediterráneo de Estudios Avanzados (UIB-CSIC)*

⁶*Observatoire Oceanologique 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 (calcificados a 450 °C durante 4 h) con un sistema de filtración de vidrio bajo presión controlada de N₂. 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 N₂ ultrapuro de 20 l (x2).
- Manómetro para bombona de N₂ 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 14^º 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 tisue 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 ± 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 ± 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 tisúes.
- 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 ± 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 fluorOLOG.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 N₂ 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⁻¹.
- 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.

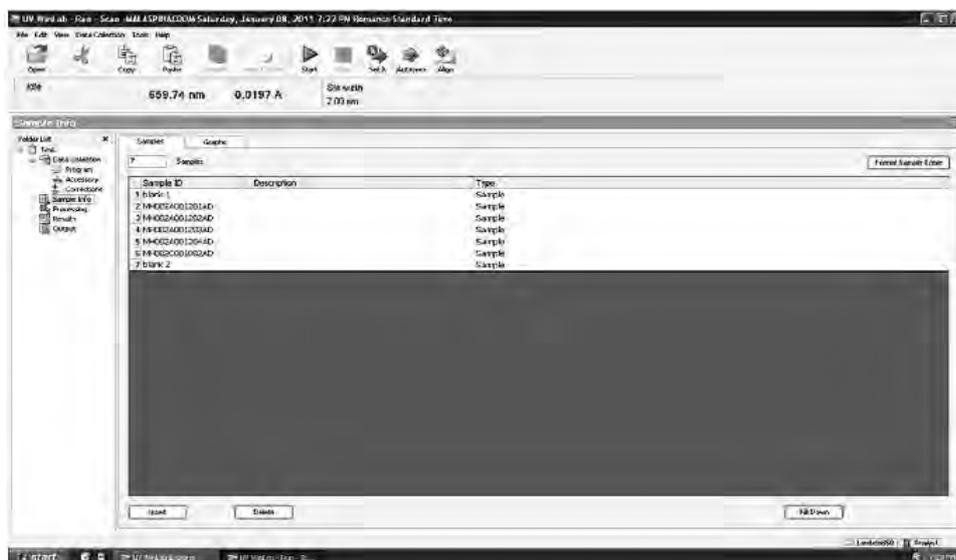
Determinación a bordo de la absorbancia

● 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.

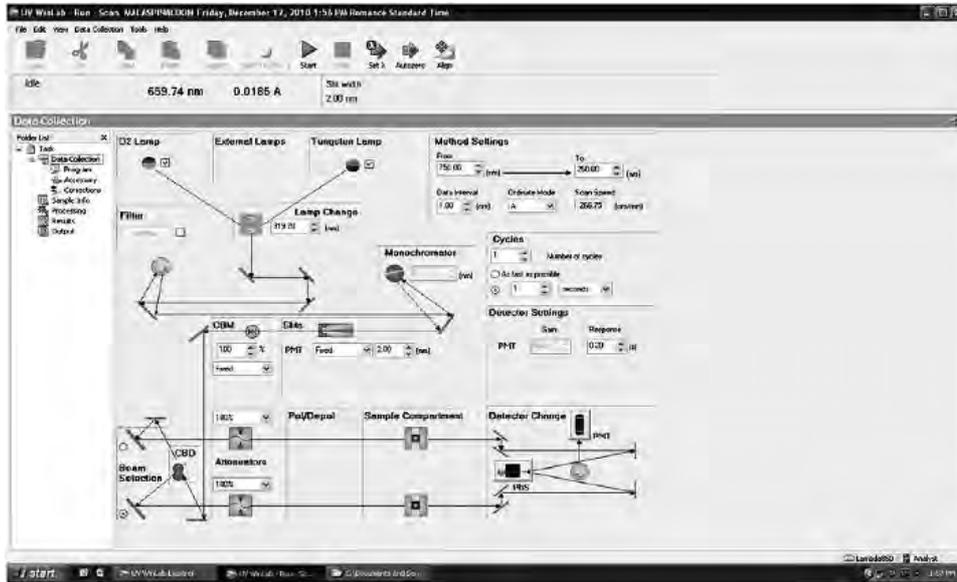
- En la pestaña “samples” escogemos el nº de muestras correspondientes (en la mayoría de los casos son 7 muestras si se trata del CTD de 200 m y 11 si se trata del CTD de 4000 m) y las nombramos con la nomenclatura oficial de la expedición MALASPINA 2010 correspondiente a cada bloque. Por ejemplo, el 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:



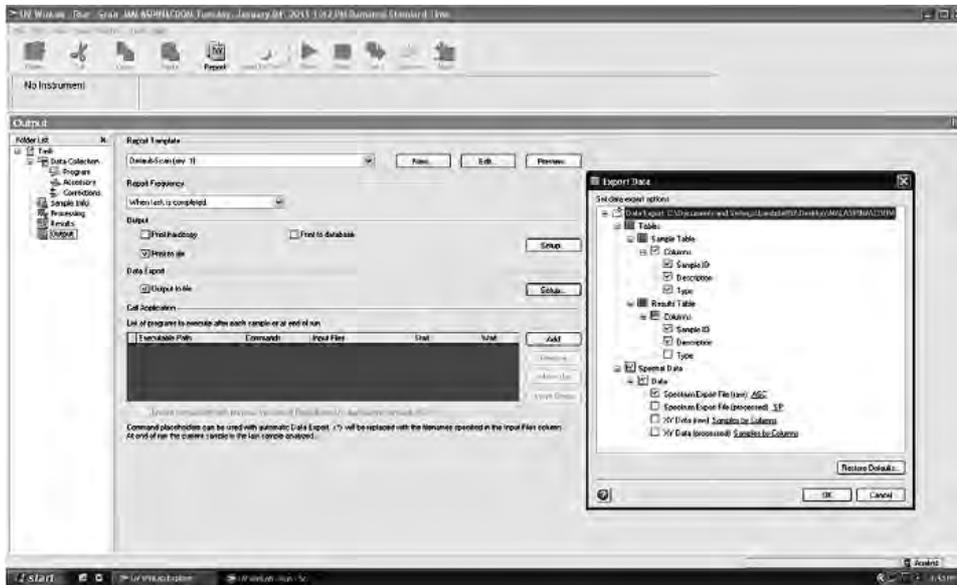
En este caso, se han programado 7 scans (5 muestras más 1 Milli-Q al inicio y otro al final). Para la roseta profunda se programarán 11 scans (8 muestras, 1 Milli-Q inicial, 1 Milli-Q intermedio y un Milli-Q final).

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.

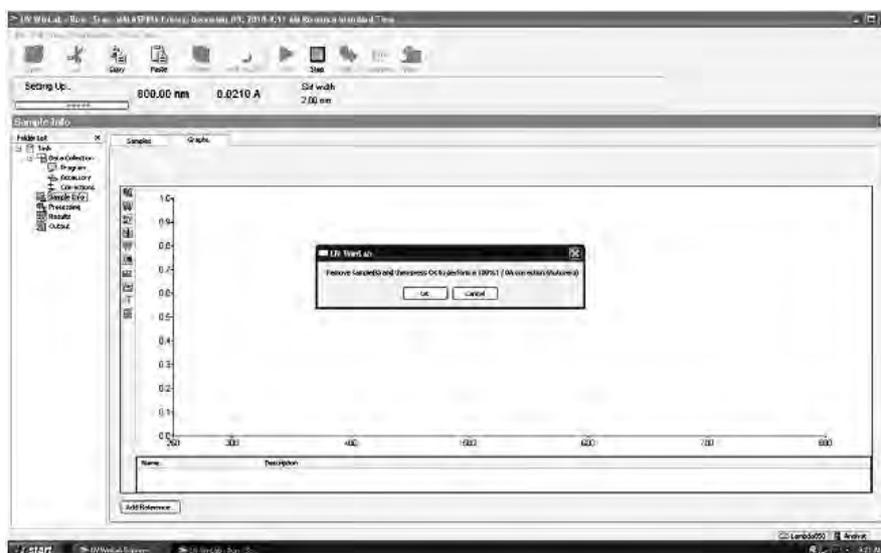


Además, en el enlace “Output” hemos configurado el directorio en el que se grabarán los datos, que será MALASPINA/CDOM en el escritorio del PC, así como el formato de los ficheros de datos que será ASCII). La correspondiente pantalla es la siguiente:

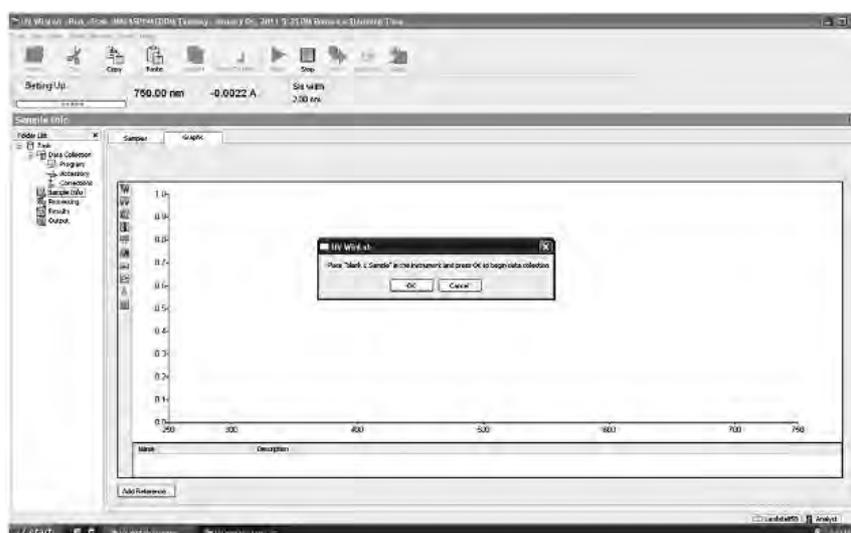


- Presionar el botón “Start” en la parte superior de la pantalla y aparecerá la siguiente pantalla:



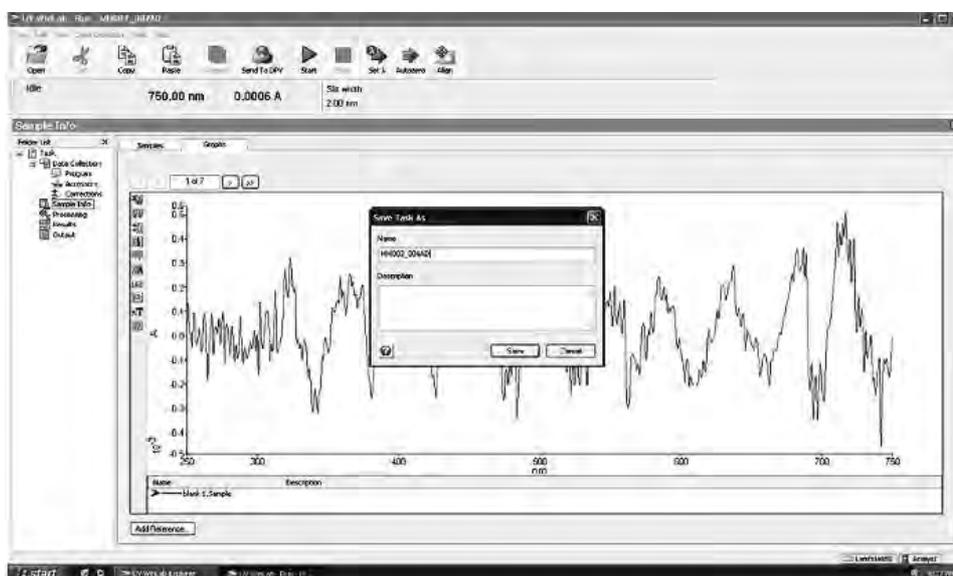


- Ponerse guantes de vinilo.
- Llenar la cubeta de referencia con agua Milli-Q recién producida evitando el desarrollo de burbujas. Secar completamente las paredes de la cubeta con tisú y colocarla en el portacubetas de referencia.
- Llenar la cubeta de medida con agua Milli-Q recién producida evitando 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 subdirectorío 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 ENFRIE 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.

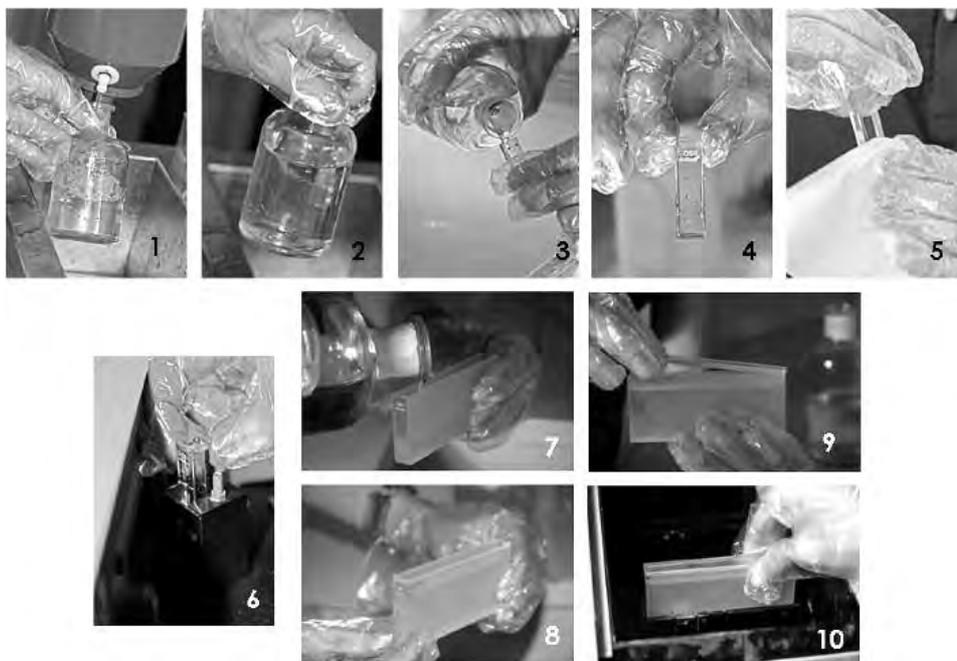
iii) **Notas/Correcciones/actualizaciones**

- 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



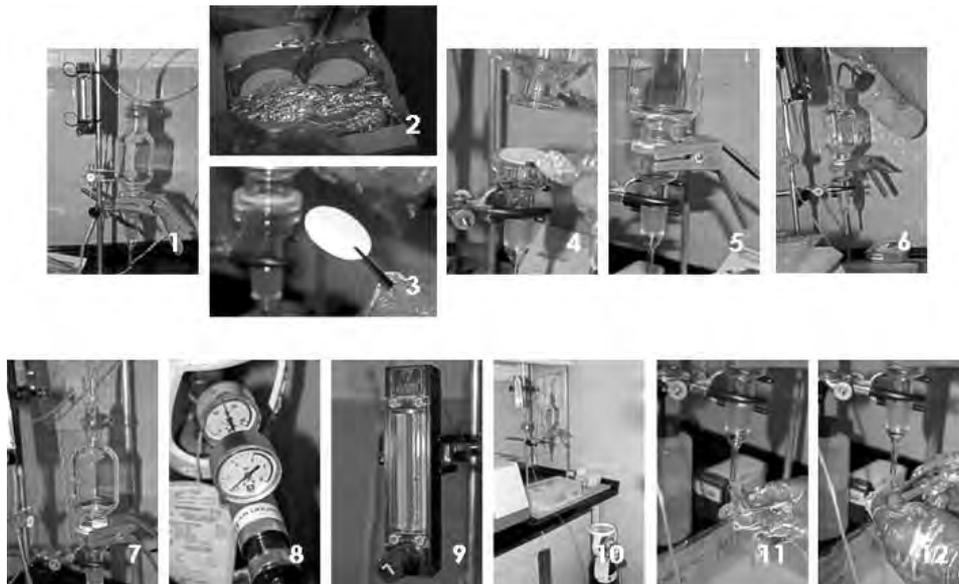
Se presenta una secuencia de fotografías numerada que muestra los pasos más relevantes del proceso de recogida, filtrado y análisis a bordo de la absorbancia (aDOM) y fluorescencia (FDOM) de muestras de materia orgánica total cromófora. (1) y (2) recogida de la muestra en frascos de vidrio de 250 ml 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 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:

$$a(\lambda) = 23.03 \cdot [ABS(\lambda) - ABS(600-750)]$$

Donde $ABS(\lambda)$ y $ABS(600-750)$ son las absorbancias a las longitudes de onda λ 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 λ 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.