

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 coccolitóforos	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

Medida de Partículas Exopoliméricas Transparentes (TEP) en agua marina

¹Mazuecos, I. P.; ²Ortega-Retuerta, E.; ¹Reche, I.

¹ *Departamento de Ecología, Universidad de Granada*
² *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 μm 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 μm 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 (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 μm 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⁻¹) 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 μm 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.

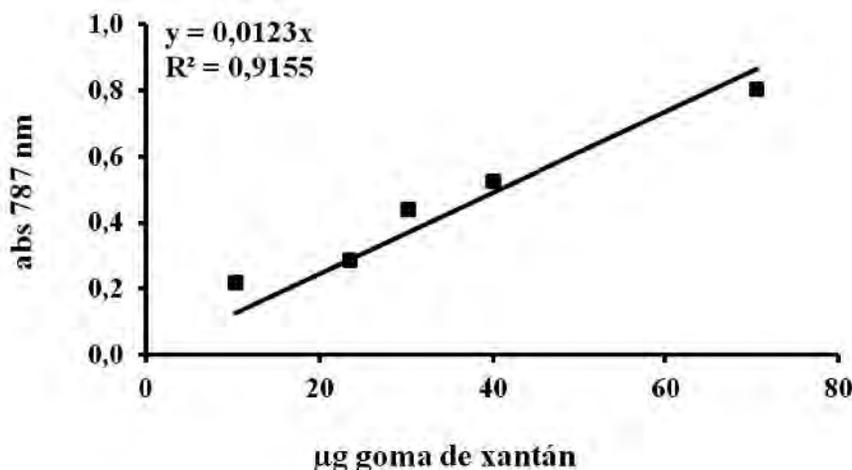


Figura 1. Ejemplo de curva de calibración absorbancia 787 nm vs μg de goma de xantano.

Descripción de la técnica

Pasos a seguir:

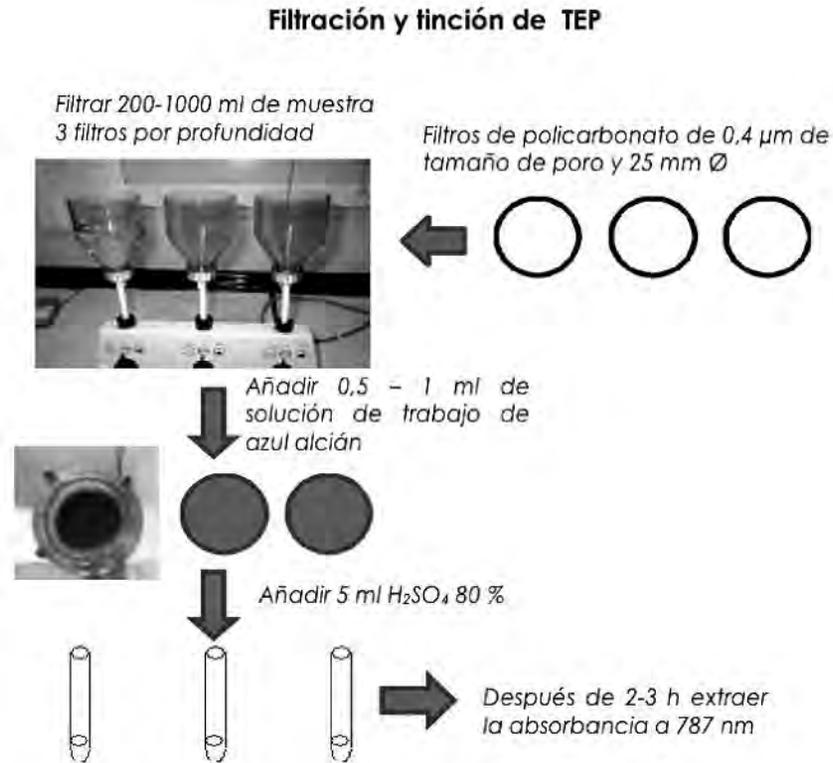
- Preparación de solución de trabajo de azul alcian.
- Recoger el agua en botellas Nalgene de 2 l para cada muestra.
- Filtrar 200-1000 ml de muestra (según saturación del filtro) a través de filtros de policarbonato de $0,4 \mu\text{m}$ de tamaño de poro. Tres filtros (réplicas) por profundidad. Usar 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 $0,2 \mu\text{m}$.

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



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⁻¹):

$$C_{TEP} = (A_{muestra} - A_{blanco}) V^{-1} F$$

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.
- PASSOW, U., A. L. ALLDREDGE. 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.
- PASSOW, U. 2002a. Production of transparent exopolymer particles (TEP) by phyto- and bacterioplankton. *Mar. Ecol. Progr. Ser.* 236: 1-12.
- PASSOW, U. 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.