

ANEXO A LOS SUBPROGRAMAS HP1 y HP2

TÉCNICAS DE ANÁLISIS RECOMENDABLES PARA LAS DIFERENTES FRACCIONES DE PLANCTON

Indicadores del grupo HP/RT-grupos funcionales y HP-biodiversidad.

Abundancia y diversidad microbiana (virus y bacterias heterotróficas). La abundancia de virus y bacterias heterotróficas se determina mediante citometría de flujo. Las muestras adquiridas mediante botellas oceanográficas tipo Niskin se fijan con glutaraldehído al 0.5% (concentración final) para el análisis de virus, y con paraformaldehído al 1% + glutaraldehído al 0.1% (concentración final), y se almacenan congeladas en nitrógeno líquido o en congelador a -80°C hasta su análisis. Las muestras para el análisis de virus se diluyen con tampón-TE (10:1 mM Tris:EDTA) y se tiñen con SYBR Green (1). Las muestras para el análisis de bacterias se tiñen con DMS (dimetil sulfato) diluido con SYBR Green, y los protocolos descritos en (2) se aplican para estimar la abundancia de bacterias con alto y bajo contenido en DNA y determinación del tamaño celular.

Picofitoplancton. Las muestras para la estimación de la abundancia de picofitoplancton se adquieren mediante botellas oceanográficas tipo Niskin, se fijan (paraformaldehído al 1% + glutaraldehído al 0.1%, concentración final) y se almacenan en nitrógeno líquido o en congelador a -80°C hasta su análisis. Las muestras se analizan mediante citometría de flujo para la estimación de abundancia y tamaño celular de acuerdo con los protocolos descritos en (2).

Nanoflagelados heterotróficos. Para la estimación de la abundancia de nanoflagelados heterotróficos, las muestras adquiridas mediante botellas oceanográficas tipo Niskin se puede analizar mediante citometría de flujo, utilizando los protocolos descritos para los componentes microbianos (2), y también microscopía de epifluorescencia en muestras teñidas con DAPI (3).

Nano- y microfitoplancton. La abundancia de nano- y microfitoplancton se puede estimar mediante técnicas tradicionales basadas en el recuento al microscopio invertido (4) o bien mediante métodos de análisis automático tipo FlowCAM (5). En el primer caso, es necesario fijar previamente las muestras adquiridas mediante botellas oceanográficas tipo Niskin con Lugol acético o formaldehído tamponado. Este último fijador es el adecuado si se pretenden preservar cocolitofóridos, componente planctónico que se puede utilizar como indicador de acidificación (sub-programa HP3 de hábitats pelágicos). En el caso de utilizar métodos automáticos tipo FlowCAM, el análisis se puede realizar a bordo sobre muestras frescas, con lo que se evitan los problemas asociados a la utilización de fijadores. Además, el conjunto de imágenes obtenidas mediante métodos automáticos se puede acoplar con técnicas de análisis de imagen para su clasificación automática, con lo que es posible obtener resoluciones taxonómicas a nivel de grupo funcional. Facilita además la estimación de características morfométricas necesarias para la estimación de biovolumen (convertible a biomasa) y estructura de tamaños (6, 7).

Microzooplancton (20-200 µm). El microzooplancton se analiza y cuantifica utilizando lupa binocular estereoscópica a partir de muestras adquiridas mediante pescas con red de plancton tipo Calvet (para muestras integradas en profundidad) o redes multi-apertura (para muestras integradas por estratos de profundidad) con mallas de 53µ de luz de malla en ambos casos. Las muestras se fijan con formaldehído tamponado al 4% (concentración final). El análisis taxonómico (recuentos por especies) se puede realizar por métodos tradicionales o a partir de imágenes capturadas y técnicas de análisis de imagen (p.ej. FlowCAM, ZooHD –fotografías al microscopio invertido con platina motorizada) que permiten resolver el componente a nivel de grupos funcionales (6).

Mesozooplancton (200-2000 µm). El mesozooplancton se analiza y cuantifica utilizando lupa binocular

estereoscópica a partir de muestras adquiridas mediante pescas con red de plancton tipo WP2 (para muestras integradas en profundidad) o redes multi-apertura (para muestras integradas por estratos de profundidad) con mallas de 200 μm de luz de malla en ambos casos. Las muestras se fijan con formaldehído tamponado al 4% (concentración final). La composición específica, espectro de tamaños y biomasa se puede analizar mediante una combinación de técnicas tradicionales, con la que se puede alcanzar una resolución taxonómica a nivel de especies, o mediante métodos automáticos (p.ej. ZooScan, ZooHD) acopladas a técnicas de análisis de imagen con las que es posible incrementar el número de muestras procesadas pero con los que se alcanza una resolución taxonómica a nivel de grupo funcional (8).

Macrozooplancton (>2000 μm), incluyendo ictioplancton. La abundancia de macrozooplancton (p.ej. krill y organismos gelatinosos) e ictioplancton se puede determinar a partir de muestras adquiridas mediante arrastres oblicuos con redes tipo Bongo de 500 μm de luz de malla (valores integrados en la columna de agua). Para resolver la estructura vertical de estos organismos, capaces en algunos casos de realizar amplias migraciones nictimerales (centenares de metros), es necesario utilizar redes multi-apertura tipo Mocness. Las muestras se fijan con formaldehído tamponado al 4%, y se pueden analizar, como ocurre con otros grupos de zooplancton, mediante técnicas tradicionales de microscopía (lupa binocular estereoscópica) o métodos automáticos acoplados con técnicas de análisis de imagen tipo ZooScan y ZooHD (8).

Indicadores del grupo HP-abundancia/biomasa

Clorofila. La concentración de clorofila, como variable subrogada de la biomasa de fitoplancton, se analiza habitualmente a partir de muestras recogidas en filtros GFF (clorofila total) o de membrana (clorofila fraccionada por tamaños), extrayéndola con acetona al 90% durante 12-24 horas y medida mediante fluorimetría (9) o espectrofluorimetría (10). Es posible obtener también estimas de la concentración de clorofila a partir de medidas de fluorescencia in situ mediante sensores automáticos acoplados a CTD-roseta oceanográfica, previa calibración de las medidas del sensor de fluorescencia con extractos acetónicos de clorofila. También es posible obtener estimaciones de la concentración de clorofila superficial (y temperatura) a partir de datos de satélite. La clorofila y la temperatura superficial presentan estructuras coherentes como revela el análisis de singularidad (11). Es posible utilizar imágenes de satélite de diferentes fuentes (clorofila a partir de MERIS y MODIS; SST a partir de MODIS, AMSR-E y Pathfinder) para identificar la presencia de estructuras térmicas (p.ej. zonas frontales, torbellinos) (12) y su relación con las distribuciones de clorofila. Además, las imágenes de satélite permiten una evaluación de la distribución de biomasa de fitoplancton a escalas sub-regionales y estimaciones de las tasas de acumulación neta de fitoplancton (13). Es posible además derivar modelos empíricos que relacionen las estimaciones de biomasa de fitoplancton basadas en imágenes de satélite y las medidas in situ de las tasas de producción primaria y otras variables relevantes, como las relaciones clorofila:carbono y el espectro de tamaños, necesarias para determinar el estado ambiental del ecosistema pelágico y escalar las estimaciones de las tasas de producción primaria a la escala regional de la Demarcación (descriptor D4).

Biomasa de zooplancton. A partir de muestras de plancton adquiridas mediante redes de plancton de diferente luz de malla y fraccionadas en serie a través de tamices de diferente tamaño de poro (p.ej 53, 200, 500, 1000, 2000 y >2000 μm) es posible estimar el peso seco total y fraccionado por clases de tamaño (14). El peso seco obtenido se puede convertir en unidades de carbono aplicando los correspondientes factores de conversión (15), con los que se obtienen estimaciones de carbono por fracciones de tamaño y la estructura de tamaños (espectro de tamaños) de la comunidad de zooplancton.

Referencias

- 1 Brussaard CPD. 2004. J. Euk. Microbiol. 51:125-138.
- 2 Calvo-Díaz A, Morán XAG. 2006. Aquat Microb Ecol 42: 159-174
- 3 Sieracki ME, Johnson PW, Sieburth JM 1985. Appl Environ Microbiol 49:799-810
- 4 Utermöhl H. 1958. Methodik Internationale Vereinigung für theoretische und angewandte Limnologie, Mitteilungen 9: 1-38
- 5 Álvarez E, López-Urrutia A, Nogueira E, Fraga S. 2011. J Plankton Res 13: 1119-1133
- 6 Álvarez E, López-Urrutia A, Nogueira E. 2012. J Plankton Res 6: 454-469
- 7 Álvarez E, Moyano M, López-Urrutia A, Nogueira E, Schareck R. 2013. doi: 10.1093/plankt/fbt069
- 8 Grosjean P, Picheral M, Warembourg C, Gorsky G. 2004. ICES J Mar Sci 61: 518-525
9. Parsons TR, Maita Y, Lalli CM. 1984. A manual of chemical and biological methods for seawater analysis. Pergamon Press.
10. Neveux J, Panouse M. 1987. 1987. Arch Hydrobiol 109: 567-581.
- 11 Nieves V, Llebot C, Turiel A, Solé J, García-Ladona E, Estrada M, Blasco D. 2007. Geophys Res Lett 34: L23602
- 12 Alvarez A, Lopez C, Riera M, Hernandez-García E, Tintore J. 2000. Geophys Res Lett 27: 2709–2712
- 13 Behrenfeld MJ, Doney SC, Lima I, Boss ES, Siegel DA. 2013. Global Biogeochem Cycles 27: 526–540
14. Nogueira E, González-Nuevo G, Bode A, Varela M, Morán XAG, Valdés L. 2014. ICES J Mar Sci 61: 508-517
- 15 Bode A, Álvarez-Osorio MT, González N, 1998. J Plankton Res 20: 1005-1014