



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

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 – José Ignacio González Gordillo

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

LIBRO BLANCO DE MÉTODOS Y TÉCNICAS DE TRABAJO OCEANOGRÁFICO

EDITOR

ENRIQUE MORENO-OSTOS



GOBIERNO
DE ESPAÑA

MINISTERIO
DE DEFENSA

MINISTERIO
DE ECONOMÍA
Y COMPETITIVIDAD



CSIC



ARMADA
ESPAÑOLA



Fundación **BBVA**



CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS
MADRID, 2012

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.; Osmá, 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 (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 (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 NH_4^+ varía desde el 50% en zonas costeras hasta el 95% en aguas oligotróficas, de los que el mesozooplancton 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_{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 O_2 y excreción de NH_4^+ del zooplancton.

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, espectrofluorímetro, N₂ 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 sodio (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 ± 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 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. H_2O 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 μm 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 μm , 500-1000 μm y >1000 μm . 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 O_2 y excreción de 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 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 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 μm . 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 NH_4^+ vendrá dada por la diferencia entre las medidas finales de concentración de NH_4^+ (resultado que proviene de restar el valor de 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).

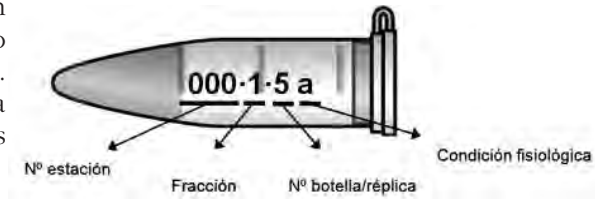
Medidas de las concentraciones intracelulares de los sustratos implicados (en laboratorio)

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:



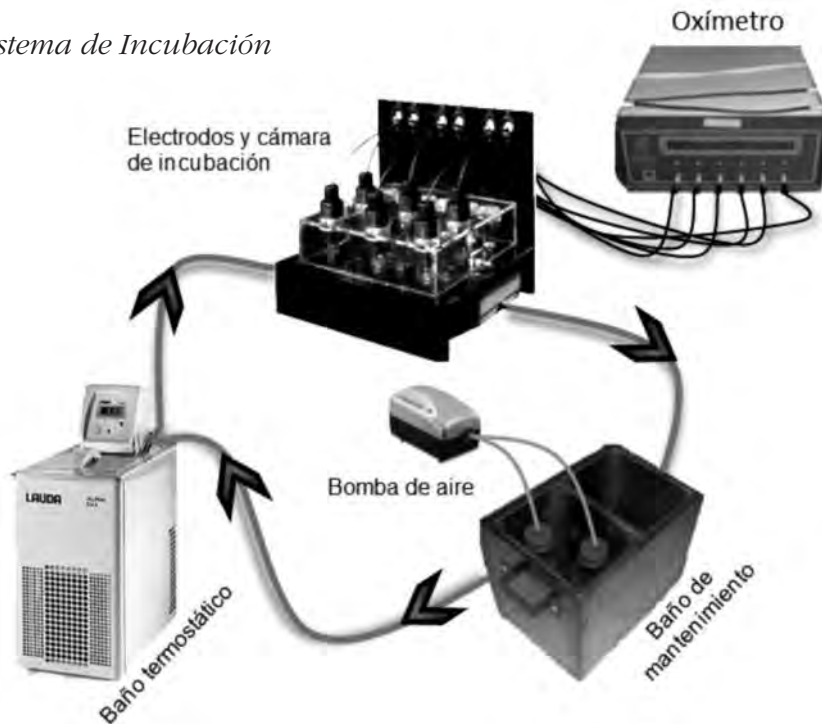
Estadillo de datos

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.

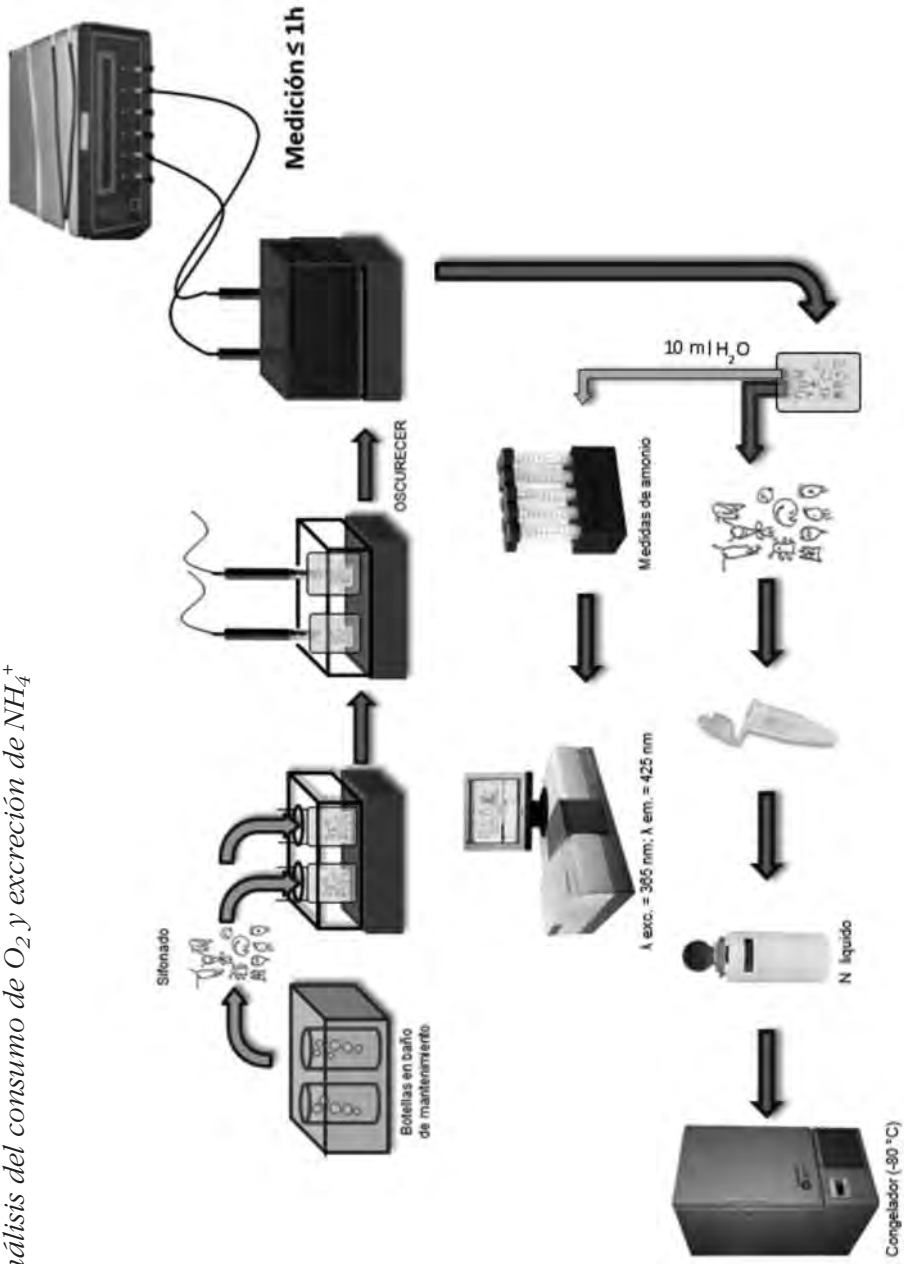
Para tasas metabólicas se recomienda anotar datos de Talla, Hora_i (local), Electrodo/channel, No. Botella, Vol. / N° muestra, Código muestra, Hora₀ incubación, Tiempo de incubación, Hora adición reactivos, Tpo. incubación con WR, Observaciones.

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 μm) 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 FALKOWSKI, P. G. y WOODHEAD, A. D. (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 mesozooplankton 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 10th 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.

