

Protocolo para la Determinación del Coeficiente de Absorción Espectral de la Luz por el Material Particulado (Total, No-Algal y Fitoplancton) en Agua de Mar

Vivian Lutz, M. Guillermina Ruiz, Valeria Segura

Resumen

Las propiedades bio-ópticas brindan una relevante información del ecosistema marino. Entre los componentes ópticamente activos en el mar se encuentra el material particulado, formado por el fitoplancton y el material no-algal (o detrito). En este informe se detalla el protocolo utilizado en el programa de “Dinámica del Plancton Marino y Cambio Climático” del INIDEP para la determinación de la absorción de luz por el material particulado. Los principales objetivos son: sistematizar la forma en que distintos investigadores del instituto realizan estas determinaciones; proveer información de cómo se realizaron las determinaciones para futuros usuarios de los datos de absorción particulada que se almacenen en la base de información institucional; y ser de utilidad para investigadores de otras instituciones que realicen estas determinaciones.





Protocolo para la Determinación del Coeficiente de Absorción Espectral de la Luz por el Material Particulado (Total, No-Algal y Fitoplancton) en Agua de Mar

Vivian Lutz^{1,2}, M. Guillermina Ruiz¹, Valeria Segura¹

(1) Instituto Nacional de Investigación y Desarrollo Pesquero (INIDEP), (2) Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Argentina.

Resumen

Las propiedades bio-ópticas brindan una relevante información del ecosistema marino. Entre los componentes ópticamente activos en el mar se encuentra el material particulado, formado por el fitoplancton y el material no-algal (o detrito). En este informe se detalla el protocolo utilizado en el programa de “Dinámica del Plancton Marino y Cambio Climático” del INIDEP para la determinación de la absorción de luz por el material articulado. Los principales objetivos son: sistematizar la forma en que distintos investigadores del instituto realizan estas determinaciones; proveer información de cómo se realizaron las determinaciones para futuros usuarios de los datos de absorción particulada que se almacenen en la base de información institucional; y ser de utilidad para investigadores de otras instituciones que realicen estas determinaciones.

Palabras Clave

Bio-óptica, Coeficiente de Absorción Material Particulado, Fitoplancton, Material No-Algal, Protocolo INIDEP

Introducción

La luz es uno de los factores más importantes que regulan la vida en el mar. Una vez que penetra la superficie del agua la luz es modificada por distintos componentes ópticamente activos, el agua misma, el material particulado y el material orgánico disuelto cromofórico (un protocolo para la determinación del coeficiente de absorción espectral de éste último se detalla en Ruiz y Lutz, 2018). El material particulado está compuesto por una variedad de elementos que se dividen para su análisis óptico en dos categorías principales: el fitoplancton y el material no-algal (o detrito). La forma del espectro de absorción entre las longitudes de onda del infra-rojo cercano y el ultravioleta, de una muestra de fitoplancton está caracterizada por los principales grupos presentes (cada especie tiene un set determinado de complejos pigmento-proteína), y por el estado de foto-aclimatación (la proporción de diversos complejos varía de acuerdo a si las células se encontraban expuestas a alta o baja intensidad de luz). Además, los cocientes entre los valores de absorción a distintas longitudes de onda, forman parte intrínseca de los algoritmos para la estimación satelital de la concentración de clorofila en forma remota. Es por eso que el estudio de las propiedades bio-ópticas marinas es importante y se encuentra ampliamente desarrollado internacionalmente (e.g., Sathyendranath et al., 1987; IOCCG, 2000) y en nuestro país (e.g., Lutz et al., 2006; Segura et al., 2013; Ruiz et al., 2020).

Detallamos aquí el protocolo usado por el programa de “Dinámica del Plancton Marino y Cambio Climático (DiPlaMCC)” del INIDEP para la determinación de la absorción de luz por el material particulado marino, en particular en las series temporales EPEA y COSTAL. Este informe tiene por objetivos: sistematizar la forma en que distintos investigadores del instituto realizan estas determinaciones; proveer información de cómo se realizaron las determinaciones para futuros usuarios de los datos de absorción particulada que se almacenen en la base de información institucional; y ser de utilidad para investigadores de otras instituciones que realicen estas determinaciones.



Este protocolo se basa en el método cuantitativo sobre filtro de Mitchell (1990), los coeficientes de amplificación del camino óptico de Hoepffner y Sathyendranath (1992), el método de determinación de detritos de Kishino et al. (1985), y una serie de recomendaciones plasmadas en protocolos establecidos por NASA y por el IOCCG (IOCCG 2018). Es importante aclarar, que si bien es inherente a las “buenas prácticas” seguir protocolos establecidos, éstos no son estáticos y varían de acuerdo a la infraestructura (instrumental principal, elementos accesorios e insumos) disponible en un laboratorio; además se van incorporando mejoras que surgen a través del tiempo.

A fin de facilitar la tarea de los operadores del instituto se ofrecen aquí detalles de la logística propia del INIDEP, incluyendo la lista de materiales a embarcar, la forma de coleccionar y preservar las muestras a bordo, y los pasos a seguir para el análisis espectrofotométrico de las mismas. Esperamos que este protocolo también sea de utilidad a colegas de otras instituciones que deseen llevar a cabo estas determinaciones. Se incluye también una explicación del procesamiento matemático para calcular los coeficientes de absorción de luz del material particulado total, no-algal y del fitoplancton.

Desarrollo y resumen de pasos del procedimiento

Muestreo a bordo

Lista de Materiales:

- Balde y cabo, botellas Niskin,
- Jarra plástica (para coleccionar el agua desde el balde)
- Mangueras de silicona cortas (para coleccionar el agua desde las botellas Niskin)
- Botellas forradas con contact negro de volumen conocido (medido al tope por pesada y anotado en el rótulo). En la EPEA normalmente se utilizan botellas de capacidad de ~ 500 ml para tomar la muestra directamente de la botella Niskin.
- 1 bomba de vacío (idealmente una de repuesto) y su correspondiente trampa de vacío
- 1 tren de filtración con capacidad para: 6 porta-filtros y embudos de filtración de 25 mm diámetro (idealmente de diámetro interno reducido ~ 12 mm para concentrar la muestra)
- 1 Kitasato grande (de al menos 4 litros) de material fuerte (vidrio o plástico de alta densidad) para utilizar de reservorio del agua filtrada
- 2 mangueras de silicona largas: una para conectar el tren de filtración al Kitasato, y otra para conectar el Kitasato a la bomba de vacío
- 1 tapón de goma o silicona de tamaño adecuado que conecte uno de los trozos de manguera al tren de filtrado con el Kitasato
- Probetas plásticas de 500 ml y de 200 ml
- Marcadores indelebles, etiquetas, lápices, tijera, papel de aluminio extra y otros elementos de librería
- Papeles de aluminio cortados en cuadrados (de ~ 8 cm de lado) para envolver las muestras y otros para tapar todos los embudos durante la filtración
- Pequeños contenedores tipo “cápsulas” (pueden ser “Histo-prep” o tapitas de agua mineral o gaseosa) para colocar los filtros con las muestras en forma extendida
- Pinzas para manipular los filtros
- Filtros de fibra de vidrio Whatman GF/F (~ 0,7 micrones de poro) de 25 mm diámetro
- Una piseta rotulada “FSW” (para poner agua de mar filtrada para enjuague del sistema de filtración)
- Una piseta rotulada “Destilada” (para poner agua destilada para enjuague del sistema de filtración)
- Termo de nitrógeno líquido o ultra-freezer a bordo



- Planillas de anotaciones a bordo

Recolección, filtrado y almacenaje

NOTA: En todo momento manipular las muestras bajo luz tenue (evitar exponerlas al sol o la luz fuerte).

1. Llenar las botellas al tope, dejándolas rebalsar y luego taparlas, ya sea directamente de las botellas Niskin o usando la manguera corta a tal fin. Para la muestra de superficie colectada con un balde (enjuagar el balde con agua de mar al menos una vez antes de cargar el agua para las muestras), puede utilizarse una jarra plástica para facilitar el trasvase a la botella.
2. Filtrar un volumen de agua de mar suficiente para obtener color bien visible (pero no muy oscuro) sobre el filtro (desde 200 ml o menos en aguas eutróficas hasta 2 o 3 litros en aguas oligotróficas oceánicas); en la EPEA el volumen más frecuente es alrededor de 500 ml. Tomar en cuenta de no prolongar el tiempo de filtrado por más de ~ 45 minutos por cada muestra.

NOTA: Si se observa que el filtro ya tiene color suficiente, no seguir filtrando agua de la botella, y medir con una probeta el volumen restante para calcular correctamente el volumen de agua total filtrado (= volumen de la botella - volumen remanente).

NOTA: ¡Recordar vaciar el Kitasato! Siempre utilizar una trampa de vacío, para evitar dañar la bomba por ingreso de agua salada. Cada tanto (dos o más campañas) hacer revisar la bomba.

3. Anotar en las planillas toda la información relevante: Estación General (EG), Fecha, hora (Local y GMT), N° Estación Proyecto (si tuviera una nomenclatura particular; ej. EPEA), Profundidad de la muestra, Volumen filtrado y cualquier observación que se considere relevante.
4. Documentar el tipo de filtros usados (idealmente siempre Whatman) en el cuaderno o planilla de campaña.
Asegurarse luego para el análisis en laboratorio de utilizar filtros de la misma marca para realizar las lecturas de línea de base y de los blancos (y en lo posible de la misma caja usada para las muestras).
5. Presión de filtrado < 35 kPa (*i.e.*, < 5 PSI). [Para evitar succionar células pequeñas].
6. Cerrar la válvula de filtración inmediatamente cuando se acaba el agua en el embudo (idealmente cuando aún quedan gotas sobre el filtro; *i.e.*, no dejarlo succionando en seco para evitar dañar las células).
7. Mientras las muestras se están filtrando preparar dos etiquetas idénticas para cada muestra (con el rótulo acordado; *e.g.*, código de campaña, n° estación, profundidad o el código designado previamente), colocar una de ellas en la parte externa de la cápsula y otra en la parte externa del envoltorio de aluminio.
8. Colocar las muestras en las cápsulas (ya rotuladas), con el lado de la muestra hacia arriba, envolver con papel de aluminio (ya rotulado).
9. Almacenaje: inmediatamente colocar las muestras en el termo de nitrógeno líquido (o ultra-freezer) a bordo. Se recomienda no dejar las muestras esperando en la mesada; el momento más crucial de degradación es inmediatamente después de la filtración. En el laboratorio en tierra, o bien se mantienen en nitrógeno líquido (controlando que no se acabe) o se pasan a ultra-freezer (-84°C). Se recomienda no guardar por más de 12 meses.



10. Antes de filtrar una nueva muestra usando el mismo set de filtración: enjuagar la base y el embudo con agua de mar filtrada (“FSW”) o agua destilada; en campañas largas enjuagar todo el sistema con agua destilada al finalizar el día de trabajo.
11. Al final de la campaña en lo posible a bordo, sino en el laboratorio en tierra: a) enjuagar bien todo el sistema de filtración primero con agua de canilla y cepillo (para arrastrar cualquier residuo pegado en las paredes), b) luego con abundante agua destilada, c) dejar secar bien y d) guardar.

En la **EPEA**: Filtrar duplicados de todas las muestras.

Análisis de las muestras en el laboratorio

Lista de Materiales a utilizar:

- Bomba de vacío
- Tren de filtración; 6 porta-filtros y embudos de filtración de 25 mm diámetro (los mismos que se usaron a bordo para filtrar las muestras)
- Filtros de fibra de vidrio de la misma marca que se haya utilizado para tomar las muestras, de ~ 0,7 micrones de poro de 25 mm diámetro.
- 2 Trozos de manguera de silicona largas: una para conectar el tren de filtración al tapón conector del Kitasato, y otra para conectar el Kitasato a la bomba de vacío
- 1 Kitasato grande, con tapón de silicona o goma de diámetro adecuado para el Kitasato, (de al menos 4 litros) de material fuerte (vidrio o plástico de alta densidad) para utilizar de reservorio del tren de filtración
- 1 Vaso de precipitado (1000 ml) con agua destilada Ultra-pura (DEST) rotulado como: “DEST”, taparlo con papel de aluminio
- 1 Recipiente grande (1 o 2 litros) para recoger el líquido descartado (puede ser la parte inferior de un bidón de agua mineral)
- Metanol grado espectroscópico, al menos P.A. (Pro Análisis)
- 1 Vaso de precipitado (250 ml) rotulado 100%Me tapado con papel de aluminio
- 1 Probeta de vidrio (volumen: 20 ml)
- 1 Probeta de plástico (volumen: 20 ml)
- Pipetas Pasteur de plástico (al menos 2)
- Pinzas para manipular los filtros
- 1 Cápsula de Petri de vidrio (~ 10 cm diámetro)
- Varias cápsulas de Petri plásticas (~ 5 cm diámetro) para poner las muestras
- Pañuelitos de papel especiales para óptica (que no liberan fibras) tipo “Kimwipe”
- Lápiz, marcadores indelebles, etiquetas, papel de aluminio; papel de aluminio para cubrir todos los embudos de filtración y evitar deposición de partículas.
- Hojas de lectura

Medición de espectros de absorción en el espectrofotómetro

Encendido y configuración del espectrofotómetro:

En el INIDEP se utiliza un espectrofotómetro (Shimadzu UV2450, doble haz, equipado con una esfera integradora). Asegurarse de que la esfera integradora esté conectada en el compartimento de lectura. Colocar las “placas blancas” de material reflectante en las posiciones 3 y 4 antes de comenzar.



NOTA: Estas placas deben retirarse y guardarse con sumo cuidado antes de remover la esfera del instrumento. Deben colocarse una vez colocada la esfera perfectamente en el espectrofotómetro. Esto es para evitar remover el polvo blanco (sulfato de bario) que sirve de superficie reflectante.

- Encender la computadora y luego el espectrofotómetro
- Iniciar el software “UVProbe” y conectar el equipo haciendo click en “CONNECT”.
 - El equipo realizará un control de funcionamiento de las lámparas y otros elementos.
- Una vez finalizado este chequeo, en la pantalla “Method”, indicar la siguiente configuración:
 - *Scanning range* (rango de lectura): 300 – 800 nm
 - *Slit* (apertura de la ranura): 5 nm
 - *Speed* (velocidad): medium
 - *Interval* (intervalo de lectura): every 1 nm
 - *Mode* (Modo): Absorption “Normal”
- Crear una carpeta con el nombre de la campaña que se analizará (e.g., aps- OB0313).
- Dejar calentar las lámparas durante unos 40 minutos antes de comenzar a leer las muestras.

Preparación de las muestras:

- Preparar cápsulas de Petri de plástico (diámetro 5 cm) limpias (cantidad necesaria para las muestras a procesar).
- Retirar un grupo de muestras del ultra-freezer. Recomendación: si se usa un tren de filtración con 6 posiciones retirar 5 muestras del ultra-freezer y reservar 1 lugar para el “Blanco”.
- Colocar las muestras en las cápsulas de Petri, removiendo con cuidado una de las etiquetas y colocarla en la tapa de la cápsula para poder identificar las mismas.
- Poner las cápsulas con las muestras en un freezer común (-20°C) hasta el momento de la lectura en el espectrofotómetro. Es recomendable en el momento de comenzar a leer las muestras, tomar 3 muestras (en sus cápsulas de Petri) del freezer normal; *i.e.*, cuando se corre la segunda sacar las próximas 2, a fin que se descongelen antes de leerlas.
- Poner un Kimwipe doblado en cuatro en la cápsula de Petri de vidrio y empapararlo con agua destilada. Esta cápsula la llamaremos de ahora en más “Petri DEST”.

NOTA: Actualmente, se usa Agua Destilada Ultra-pura (DEST) para el Blanco, para humedecer los filtros y luego para el lavado de las muestras de detrito, en lugar de “agua de mar filtrada” usada anteriormente en el protocolo de determinación del INIDEP. Este cambio se realizó para una mayor practicidad y porque el agua destilada cumple la misma función, no produce diferencias, y además se comprobó que en algunas ocasiones el agua de mar filtrada puede contener restos de ficobilinas que son solubles en agua y luego producen un sesgo en la lectura del detrito.

Lectura de los espectros de densidad óptica

Consideraciones básicas:

(detalles y orden de las lecturas más abajo)

- Antes de cada lectura colocar el filtro de la muestra sobre la “Petri DEST” hasta que quede empapado en agua destilada.



- Secar el exceso de agua del filtro tocando ligeramente el filo del filtro sobre un Kimwipe limpio.
- Poner el filtro en el porta-muestras asegurándose que cubra la mayor superficie posible de la abertura (para evitar el ingreso de luz espuria al fotomultiplicador).
- Guardar tres veces:
 - Primero dándole un nombre inmediatamente cuando termina la corrida
 - Segundo apretando en “save”
 - Tercero en file/save as/ txt table.
- Medir con un calibre y anotar en el cuaderno o planilla de lectura el área de filtrado (la marca de la muestra) sobre cada uno de los porta-filtros; luego se calcula un promedio. (Como mínimo anotar si se usaron los embudos de vidrio o de plástico y su diámetro nominal).
- Cuando se cambian los filtros del tren de filtración (luego del procesamiento para el material particulado no-algal), limpiar los embudos y porta-filtros usando un cepillo a fin de remover cualquier partícula adherida y enjuagar con agua destilada antes de usarlos nuevamente.
- Anotar la marca de filtros usados en las muestras, líneas de base, blancos (especificar que se utilizó DEST).

Lectura de las líneas de base

Línea de base de "aire vs aire":

- a. Apretar el botón “baseline”. El equipo guardará en la memoria pero no mostrará en la pantalla el espectro a medida que recorre las longitudes de onda.
- b. Registrar el espectro de la línea de base “aire vs aire”: apretar “start” y correr el espectro de “aire-aire” (ahora sí lo mostrará). Este debe tener valores dentro de un rango de $0 \pm 0,002$. Es una manera de constatar el buen funcionamiento del equipo antes de comenzar. Nombrar este espectro: “airairDDMMYY-XX”, donde DDMMYY es la fecha de la lectura y -X representa un número consecutivo de lecturas (e.g., “airair270114-01”).
- c. Guardar tres veces la lectura del espectro como ya indicado.

Línea de base de los filtros:

- d. Humedecer 2 filtros GF/F nuevos (ver explicaciones de humedecimiento en consideraciones básicas). Adherir los filtros sobre los dos porta muestras (ver detalles de cobertura de la abertura en consideraciones básicas).
- e. Colocar en el espectrofotómetro los dos porta-muestras (en posición “S” y “R”) y apretar el botón “baseline”. El equipo recorrerá nuevamente el rango de longitudes de onda y guardará ahora en memoria esta lectura.
- f. Registrar el espectro de la línea de base de los filtros: apretar “start” y correr el espectro de los 2 GF/F (ahora sí lo mostrará). Este debe ser muy cercano a cero, dentro de un rango de $\pm 0,005$. Nombrar este espectro: “LBTDDMMYY-XX”, donde DDMMYY es la fecha de la lectura y -X es un número consecutivo (e.g., “LBT270114-01”). Salvar tres veces como indicado anteriormente (consideraciones básicas).
- g. Colocar y conservar los filtros usados para adquirir la línea de base en cápsulas de Petri plásticas separadas y rotuladas: “baseline-R” (para el filtro que se colocó en la posición de la referencia (R)) y “baseline-S” (para el filtro que se colocó en la posición de la muestra (S)).



Consideraciones sobre las líneas de base:

A fin de controlar cualquier deriva del instrumento cada ~ 6 lecturas (e.g., cada set de muestras que se pone a extraer en metanol (se verá en el siguiente paso “no-algal”):

- I- Cambiar el Kimwipe de la “Petri DEST” y agregarle nueva DEST (debe quedar saturado);
- II- leer nuevamente la baseline sin cambiar el lugar de los filtros y sin apretar el botón “baseline” correr el espectro;
 - si es chato (dentro del rango $\pm 0,005$) alrededor de cero, está bien; nombrarlo “LBTDDMMYY-XX”;
 - si es chato (dentro del rango $\pm 0,005$) pero NO alrededor de cero, remover los filtros, mojarlos nuevamente en el “Petri DEST” remover exceso de agua, asegurándose que estén igualmente húmedos y registrar el espectro nombrándolo: “LBTDDMMYY-XX”;
 - el promedio de la baseline corrida antes de las muestras y la corrida luego de 6 lecturas (blancos y muestras) servirá para corregir estas lecturas por la deriva producida.
 - tomar el filtro “baseline-S” (que se usó solo un par de veces) y un filtro GF/F nuevo humedecer los dos filtros nuevamente (ver consideraciones básicas); apretar “baseline” (se guardará en la memoria) y luego registrar el espectro nombrándolo: “LBTDDMMYY-XX”; si este espectro NO es chato (dentro del rango $\pm 0,005$) alrededor de cero, tomar dos GF/F nuevos y repetir el procedimiento.

Lectura del blanco

- h. Preparar un blanco por día, o sesión de lectura, con un GF/F nuevo de la siguiente forma:
 - Colocar el filtro en el tren de filtración, llenar la copa de filtración con DEST, mantener la válvula de vacío cerrada por aproximadamente 1 hora (tiempo aproximado utilizado para el filtrado de las muestras a bordo), y luego filtrar. Mantener en una cápsula de Petri rotulada “Blanco”.
- i. Correr un espectro del Blanco (filtro colocado en la posición de la muestra “S”) contra un filtro GF/F de referencia (“baseline-R”), asegurándose que estén igualmente húmedos con DEST (consideraciones básicas). Nombrar este espectro “BLTDDMMYY-XX”.
- j. Salvar tres veces como ya indicado (consideraciones básicas).

Lectura de las muestras de Material Particulado Total

- k. Colocar la muestra en la posición “S” y correr un espectro contra un filtro GF/F de referencia (“baseline-R”), asegurándose que estén igualmente húmedos con DEST (consideraciones básicas).
Para el caso de la EPEA nombrar el espectro de acuerdo a lo ya estipulado (Inf. Ases. Transf. INIDEP 59/2019):
 - 1) el número de campaña según la nueva numeración (14 caracteres), 2) el número de estación general (5 caracteres), 3) el nombre de la estación “EPEA” (4 caracteres), 4) la profundidad de muestreo (4 caracteres), 5) la variable registrada (2 caracteres: “RP” para la densidad óptica del material particulado total y “RD” para el material particulado no-algal) y 6) la réplica (3 caracteres); de forma:
<“Nro de EPEA”_ “EGRAL”_ “EPEA”_ “Prof_mues”_ “Variable”_ “Réplica”>
Ejemplo “184_133_AH0718_EG050_EPEA_000m_RP_A-1”.



NOTA: agregar el elemento “réplica” aún cuando no hubiera replicas (*i.e.*, todas las letras serán seguidas de 1: A-1, B-1, C-1, etc.). Esto es para luego facilitar la corrida del programa de procesamiento de datos.

- l. Salvar como siempre tres veces.
- m. Guardar las muestras ya leídas nuevamente en sus cápsulas rotuladas.

NOTA: Cada 2 lecturas, remover el filtro GF/F de referencia del porta-muestra y mojarlo en DEST (consideraciones básicas).

Lectura del espectro de densidad óptica del Material Particulado No-Algal (o “Detrito”)

- n. Poner los filtros (blanco y muestras) sobre el tren de filtración, mantener trazabilidad colocando las cajitas Petri rotuladas en frente de cada muestra (embudo), con las válvulas cerradas.
- o. Agregar 10 ml de metanol puro (100 %) con una probeta (escurrir lentamente por el borde y paredes del embudo evitando remover el material sobre el filtro) y dejar por aproximadamente 1 minuto.
- p. Abrir las válvulas del tren de filtración y filtrar con la bomba de vacío.
- q. Agregar nuevamente 15 ml de methanol-100% con una probeta (escurrir lentamente por el borde y paredes del embudo evitando remover el material sobre el filtro) y dejar cerradas las válvulas por aproximadamente 1 hora.
- r. Filtrar con la bomba de vacío el remanente de metanol.
- s. Enjuagar los bordes del embudo con unos pocos mililitros de metanol (con una pipeta Pasteur) y filtrar (esto es para arrastrar partículas que puedan haber quedado adheridas a las paredes del embudo).
- t. Agregar 20 ml de DEST utilizando una pequeña probeta (escurrir lentamente por el borde y paredes del embudo evitando remover el material sobre el filtro). Esto es para disolver y eliminar las sales precipitadas por el metanol.
- u. Filtrar con la bomba de vacío.
- v. Conservar las muestras en las cápsulas Petri rotuladas hasta su lectura.
- w. Leer los espectros de densidad óptica de los filtros del material No-Algal o detrito comenzando por la lectura Líneas de Base, del Blanco y luego las Muestras, repitiendo los pasos que se llevaron a cabo en las lecturas de las muestras del material particulado total.
Recordar nombrar los espectros de la siguiente manera:
<“Nro de EPEA”_“EGRAL”_“EPEA”_“Prof_mues”_“Variable”_“Réplica”>
Ejemplo “184_133_AH0718_EG050_EPEA_000m_RD_A-1”.
- x. Salvar tres veces como siempre.
- y. Pegar el rótulo al lado del nombre de archivo en las hojas de lectura, hacer esto recién en la lectura de detrito ya que la muestra luego se descarta (no es necesario seguir trazando su paradero en las cajitas Petri).

NOTA: Cada 2 lecturas, remover el filtro GF/F de referencia del porta-muestra y mojarlo en DEST (como ya se ha explicado).

Al finalizar las mediciones

- Asegurarse que los archivos estén correctamente registrados y hacer un **backup inmediatamente** de los mismos en un pen-drive y en otra computadora antes de apagar la computadora del espectrofotómetro.



- Lavar con agua destilada los porta-muestras y secarlos con un Kimwipe.
- Si no se van a leer más muestras próximamente, sacar la esfera integradora (removiendo primero las placas blancas con cuidado), y guardarla en su caja.
- Transferir el líquido de descarte del Kitasato (metanol + agua de mar) a un contenedor adecuadamente rotulado. Usar guantes y hacer este traspaso en la campana de gases. Contactar al encargado del Droguero para entregar los solventes de desecho.
- Limpiar todos los materiales con cepillo para remover cualquier partícula, y enjuagar con agua destilada, dejar secar bien y almacenar en su lugar adecuado lo antes posible.

Cálculo de los Coeficientes de Absorción: Material Particulado Total, Material No-Algal y Fitoplancton

Es usual la utilización de rutinas de programación para el cálculo de los coeficientes de absorción finales, ya que cada espectro consta en nuestro caso de 500 datos (longitudes de onda entre 300 y 800 nm), los cuales requieren una serie de correcciones y transformaciones; considerando que en una campaña extensa se pueden sumar 100 o más muestras es eficiente y recomendable trabajarlos en forma sistematizada. En el programa DiPlaMCC se han desarrollado rutinas y se utilizan diversos programas escritos en lenguaje Fortran y R.

Aquí se describen en forma breve y conceptual los pasos necesarios para convertir los datos crudos de densidad óptica en coeficientes de absorción (en unidades de m^{-1}).

- A los valores de cada espectro de densidad óptica, D , se les resta el valor correspondiente al promedio de D entre 800 y 750 nm. Este valor denominado “nulo”, corresponde a la absorción por componentes no pigmentarios y se asume que tiene una forma espectral neutra.
- Los espectros de los blancos (BL) y las líneas de base (LBT) se leen cómo control, si no hubiera problemas con el instrumento no se utilizan en los cálculos.
 - En el caso del espectrofotómetro Shimadzu UV-2450 del INIDEP, se ha detectado en los últimos años (aproximadamente desde 2019) una cierta deriva razón por la cual se realiza preventivamente una corrección por LBT. Esto es:
 - Se calcula el promedio de las LBT leídas al comienzo y al final de un set de muestras y éste es restado de los espectros de las muestras correspondientes (previa substracción del valor nulo en las LBT y las muestras).
- Los espectros de D corregidos por el valor nulo (y por la LBT si fuese necesario) son convertidos a coeficientes de absorción sobre filtro A_f aplicando las siguiente formula:

$$A_f(\lambda) = 2,3 D(\lambda) / X$$

donde:

X (m) está dado por V/S (V = volumen de agua de mar filtrada en m^3 y S = la superficie efectiva de filtración sobre el filtro en m^2)

2,3 es el factor de conversión de logaritmo decimal a natural

- Los espectros de A_f son convertidos a absorción en suspensión, A_s , corrigiendo por el factor de amplificación de la luz en el filtro (o factor Beta) utilizando la ecuación:

$$A_s(\lambda) = G[A_f(\lambda)] + H[A_f(\lambda)]^2$$

donde:

$G=0,31$ y $H=0,57$ son coeficientes fijos (Hoepffner y Sathyendranath, 1992)



- Aplicando los pasos descriptos se llegan a obtener los coeficientes de absorción del material particulado total $AP(\lambda)$ y del material particulado no-algal $ANAP(\lambda)$.
- Finalmente los coeficientes de absorción del fitoplancton se obtienen por sustracción $AF(\lambda)=AP(\lambda)-ANAP(\lambda)$.
- En el caso de la EPEA que usualmente se leen réplicas, el paso final implica el control de calidad (inspección visual) y cálculo del promedio de los espectros de las mismas.
- Luego del procesamiento de los datos, cuando se crean los archivos output de absorción, se mantiene el patrón de nombres, para la EPEA:

<“Nro de EPEA”_“EGRAL”_“EPEA”_“Prof_mues”_“Variable”_“Letra indicadora del orden de profundidad”>

Ejemplos:

material particulado total: “184_133_AH0718_EG050_EPEA_000m_AP_A”

material particulado no-algal: “184_133_AH0718_EG050_EPEA_000m_AD_A”

fitoplancton: “184_133_AH0718_EG050_EPEA_000m_AF_A”

Bibliografía

- HOEPPFNER N, SATHYENDRANATH S. 1992. Bio-optical characteristics of coastal waters: absorption spectra of phytoplankton and pigment distribution in the western North Atlantic. *Limnol. Oceanogr.* 8, 1660-1679.
- IOCCG. 2000. Remote sensing of ocean colour in coastal, and other optically-complex, waters. Sathyendranath S. (ed.), Reports of the International Ocean-Colour Coordinating Group, N°3, IOCCG, Dartmouth, Canada.
- IOCCG PROTOCOL SERIES. 2018. Inherent Optical Property Measurements and Protocols: Absorption Coefficient. Neeley AR and Mannino A (eds.), IOCCG Ocean Optics and Biogeochemistry Protocols for Satellite Ocean Colour Sensor Validation, Volume 1.0, IOCCG, Dartmouth, NS, Canada.
- KISHINO M, TAKAHASHI M, OKAMI N, ICHIMURA S. 1985. Estimation of the spectral absorption coefficients of phytoplankton in the sea. *Bull. Mar. Sc.* 37, 634-642.
- LUTZ VA, SUBRAMANIAM A, NEGRI MR, SILVA RI, CARRETO JI. 2006. Annual variations in biooptical properties at the "Estación Permanente de Estudios Ambientales (EPEA)" coastal station, Argentina. *Cont. Shelf Res.* 26:1093-1112.
- MITCHELL BG. 1990. Algorithms for Determining the Absorption Coefficient of Aquatic Particulates Using the Quantitative Filter Technique (QFT). *Ocean Optics X*, Orlando, Florida, SPIE.
- RUIZ MG, BERGHOFF CF, SEGURA V, LUTZ V, NEGRI RM. 2019. Sistematización de la base de datos de variables bio-ópticas de la Estación Permanente de Estudios Ambientales (EPEA). *Inf. Invest. INIDEP* N° 059, 13 pp.
- RUIZ MG, LUTZ V, SEGURA V, BERGHOFF C, NEGRI R. 2020. The color of EPEA: Variability in the bio-optical properties in the period 2000 – 2017. *Marine and Fishery Sciences*, 33: 205-225. <https://doi.org/10.47193/mafis.3322020301105>
- RUIZ MG, LUTZ V 2018. Protocolo para la determinación del coeficiente de absorción espectral del material orgánico coloreado disuelto “CDOM”. Informe de Investigación INIDEP N° 129/2018.
- SATHYENDRANATH S, LAZZARA L, PRIEUR L. 1987. Variations in the spectral values of specific absorption of phytoplankton. *Limnol. Oceanogr.* 32: 403-415.
- SEGURA V, LUTZ VA, DOGLIOTTI AI, SILVA R, NEGRI R, AKSELMAN R, BENAVIDES H. 2013. Phytoplankton Types and primary production in the Argentine Sea. *Mar Ecol Prog Ser* 491: 15-31.