



INIDEP

INSTITUTO NACIONAL DE INVESTIGACIÓN
Y DESARROLLO PESQUERO

**INFORME DE
ASESORAMIENTO
Y TRANSFERENCIA**

Número	Páginas	Fecha de aprobación
0 2 9	2 7	2 4 FEB 2017
Dirección		
DIRECCIÓN DE PESQUERIAS DE INVERTEBRADOS, PECES PELAGICOS Y AMBIENTE MARINO		
Programa / Gabinete		
Pesquerías de Crustáceos		
Actividad		
CRUS16		

ESTIMACIONES DE PRODUCCIÓN PRIMARIA EN EL INIDEP. PARTE I: PROTOCOLO DE MUESTREO DE CAMPO Y PROCESAMIENTO DE MUESTRAS DE PRODUCCIÓN PRIMARIA.

La sustentabilidad de un ecosistema incluyendo a sus eslabones superiores como los peces, moluscos y crustáceos de interés comercial depende del flujo de energía entre sus componentes. Es por lo tanto fundamental conocer las tasas de producción, especialmente la fitoplanctónica o 'producción primaria' única fuente de síntesis del material orgánico del cual están formados todos los organismos de la cadena trófica.

El objetivo general de este trabajo es presentar las consideraciones teóricas, los aspectos prácticos y los cálculos matemáticos de las mediciones de producción primaria que se llevan a cabo en el INIDEP desde el año 2008. El mismo está organizado en dos informes (Parte I y Parte II). Aquí se presenta la Parte I: Protocolo de muestreo de campo y procesamiento de muestras de producción primaria, cuyo objetivo particular es describir los aspectos prácticos de la técnica de Hama *et al.*, 1983 modificada para medir la producción primaria de campo a partir de incubaciones *P versus I* a bordo de buques de investigación y el posterior procesamiento de muestras en tierra en el laboratorio de Producción Primaria y Bio-toxicidad del INIDEP.

Citar Indicando la fuente. El contenido no debe ser reproducido total o parcialmente sin la expresa conformidad del INIDEP

SOLICITADO POR	Institución	Cargo
	INIDEP	

PREPARADO POR

Firma:

Nombre: SEGURA, VALERIA

Firma:

Nombre: LUTZ, VIVIAN ALICIA

APROBADO POR

Jefe de Programa / Gabinete

Dr. MARCELO PAJARO
A/C DIRECCION
Pesquerías de Invertebrados,
Peces Pelágicos y Ambiente Marino
Director de área

Dr. OTTO C. WÖHLER
Director Nacional de Investigación
INIDEP

Director del INIDEP



ESTIMACIONES DE PRODUCCIÓN PRIMARIA EN EL INIDEP. Parte I: Protocolo de muestreo de campo y procesamiento de muestras de producción primaria

Valeria Segura¹ y Vivian Lutz¹

1. Instituto Nacional de Investigación y Desarrollo Pesquero

INTRODUCCIÓN

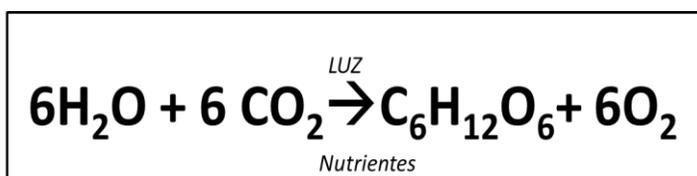
La sustentabilidad de un ecosistema incluyendo a los eslabones superiores como los moluscos, crustáceos y peces de interés comercial depende del flujo de energía entre sus componentes. Este flujo de energía está dado por un balance entre la producción y la pérdida de biomasa en cada uno de los niveles tróficos. La abundancia de los organismos de los niveles tróficos superiores está determinada por el alimento disponible que tienen durante un periodo crítico del desarrollo larval. La supervivencia de las larvas y consecuentemente la abundancia de los adultos de una especie de nivel trófico superior va a depender de las variaciones en la duración y la amplitud del florecimiento fitoplanctónico (Cushing, 1982; Platt *et al.*, 2003).

El fitoplancton marino contribuye aproximadamente a la mitad de la producción primaria en el planeta (Longhurst *et al.*, 1995) con una tasa de fijación de carbono estimada en 43,5 Pg C (1 Pentagramo = 10^{15} gramos) por año (Behrenfeld & Falkowski, 1997). Además, de la importancia que tiene en las tramas tróficas, el fitoplancton juega un rol fundamental en el control del clima en la tierra, atenuando el aumento de la temperatura en la atmósfera al consumir CO_2 en el proceso de fotosíntesis (Falkowski, 2002; Frouin & Iacobellis, 2002; Falkowski *et al.*, 2003). En consecuencia, las estimaciones de la producción



primaria (fotosíntesis) fitoplanctónica realizada por el fitoplancton (Platt *et al.*, 1984) son fundamentales.

Existen varios métodos para medir las tasas de producción primaria (*PP*). Los métodos que evalúan la asimilación de alguno de los productos de la fotosíntesis como el carbono o la evolución de O_2 (ver ecuación) en una muestra de agua llamados **métodos directos** y los que se basan en la variación temporal de alguna variable como por ejemplo la concentración de la clorofila **a** llamados **métodos indirectos**. El presente trabajo de investigación está enfocado en presentar los métodos directos.



Ecuación de Fotosíntesis: en forma simple se producen carbohidratos, y se libera oxígeno, a partir de la hidrólisis del agua y la fijación de dióxido de carbono, utilizando la luz como fuente de energía y los nutrientes como factor esencial para el crecimiento del fitoplancton.

1) *Evolución de O_2*

Este método es relativamente sencillo y consiste en que muestras de agua de mar se coloquen en botellas y se incuben durante un periodo de tiempo ya sea volviendo la botella con la muestra a la profundidad donde fue colectada (*in situ*) o exponiendo la botella (en el laboratorio a bordo) a la intensidad de luz medida en el mar a la profundidad donde se tomo la muestra. Los cambios ocurridos en la concentración de oxígeno disuelto se miden usando el método de Winkler (Parsons *et al.*, 1984). Es importante mencionar que la concentración de oxígeno determinada por este método se ve afectada por la respiración no solo del fitoplancton, sino también del zooplancton y bacterias que se encuentran en la



muestra, es decir, mide el metabolismo de la comunidad, en lugar de solo evaluar la producción primaria fitoplanctónica. No es aconsejable usarlo en aguas oligotróficas u océano abierto donde las concentraciones de fitoplancton son generalmente bajas ($< 1.0 \text{ mg C l}^{-1}$) debido a su baja sensibilidad.

2) *Asimilación de carbono*

El principio de este método se basa en adicionar una cantidad conocida de bicarbonato de sodio ($\text{NaH}^{12}\text{CO}_3$) con trazadores isotópicos como $^{14}\text{CO}_2$ o $^{13}\text{CO}_2$ a una muestra de agua. Después de un tiempo determinado de incubación, el carbono inorgánico es incorporado por las células de fitoplancton en el proceso de fotosíntesis obteniéndose materia orgánica marcada con trazadores isotópicos. La utilización de estos isotopos de carbono para medir la fotosíntesis se debe principalmente a que su abundancia en la naturaleza es muy baja (1,1% ^{13}C y 0,0001- ^{14}C) (Falkowski & Raven, 2007). El método más frecuentemente utilizado hasta el presente ha sido el de la asimilación del ^{14}C (Steemann Nielsen, 1952). Dando como resultado, la estimación de la producción bruta, es decir, la fotosíntesis a tiempos cortos de incubación o la producción neta (fotosíntesis menos la respiración) en periodos más largos de incubación. El método de asimilación del ^{14}C , significó un avance con respecto al método de O_2 , por tener la sensibilidad adecuada para ser usado en aguas oligotróficas. Sin embargo, el mismo representa un riesgo para la salud humana y para el ambiente al utilizar un trazador radioactivo. Por esta razón, es que se ha legislado su uso exigiéndose medidas de manejo como por ejemplo: laboratorios certificados, uso restringido y exclusivo de las sustancias radioactivas y licencias para comprarlas.

Otro método que se ha puesto en práctica en los últimos años fue el método de Hama *et al.*, 1983, el cual utiliza un isotopo de masa ^{13}C para estimar la producción primaria, el cual es inofensivo para la salud humana. En un principio, se ha utilizado en conjunto con el nitrógeno 15 (^{15}N) como una técnica de doble marcado (Slawyk *et al.*, 1977; 1979), y posteriormente como una alternativa a la



técnica de ^{14}C principalmente en áreas donde el uso de trazadores radiactivos está prohibido (Hama *et al.*, 1983).

A partir de las mediciones directas se puede obtener la producción primaria en un momento dado, llamada producción primaria instantánea, P_0 , luego considerando que la luz disponible varía a lo largo del día se puede calcular la producción primaria diaria, P_D . Para estimar la P_D es necesario conocer las características fotosintéticas de la comunidad fitoplanctónica, es decir los parámetros fotosintéticos. Para ello, se ajustan las denominadas **curvas P vs I** , a partir de las medidas de asimilación de carbono (POC) en experiencias de incubación a distintas intensidades de luz (I) en un periodo de tiempo (Fig.1).

Curvas P vs I

El ajuste de las curvas P versus I permite obtener los principales parámetros fotosintéticos: α^B (la pendiente inicial: la eficiencia fotosintética a baja intensidad de luz, normalizada por la clorofila) y P_m^B (la producción máxima a saturación de luz, normalizada por la clorofila) (Fig.1).

La producción primaria en la columna de agua diaria, o incluso a lo largo del año, P_{ZT} se puede estimar utilizando modelos. Los modelos más comúnmente usados requieren como datos de entrada: 1) dos variables: la concentración de la clorofila a y la intensidad de luz; y 2) los dos parámetros fotosintéticos principales. Las magnitudes de la concentración de clorofila a y la intensidad de luz pueden ser estimadas en la actualidad a través de sensoramiento remoto. Sin embargo, los parámetros fotosintéticos tienen que ser determinados realizando experiencias de incubación en campo.

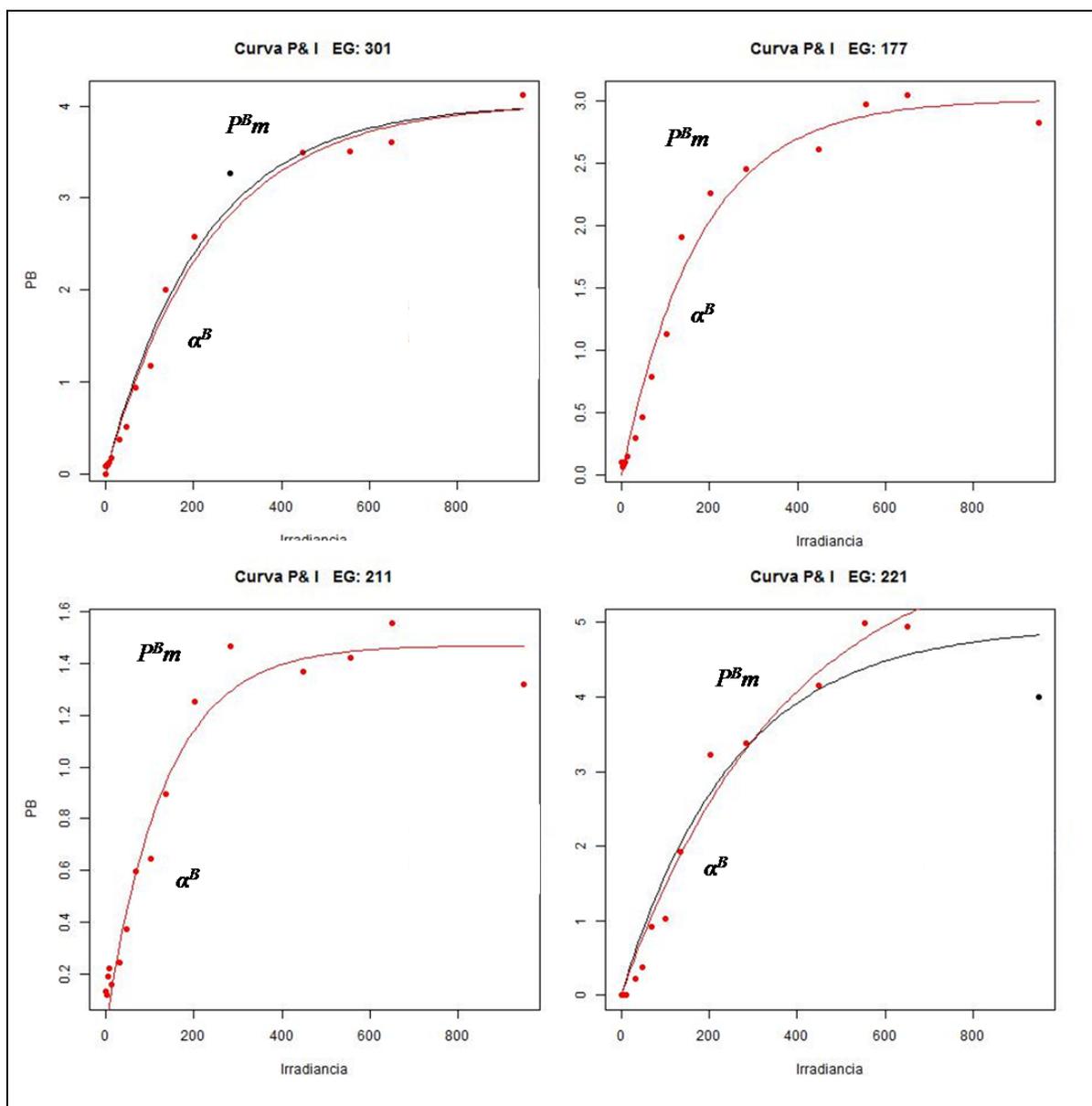


Figura 1. Ejemplos de una curva P versus I obtenida durante la campaña OB03/2008 (INIDEP).

Los trabajos sobre producción primaria (PP) en el Mar Argentino son escasos; las primeras publicaciones datan de la década del '60. El objetivo de los mismos era realizar mediciones de producción primaria “*in situ*” en la plataforma argentina, el talud continental, el Pasaje de Drake y el Mar de Weddell en el marco



de un programa de colaboración científica entre Argentina y Estados Unidos (El Sayed, 1964; Mandelli, 1965; Mandelli & Orlando, 1966; El Sayed, 1968). A finales de los `60 se determinó la producción primaria en una amplia región del Mar Argentino en el marco de una serie de campañas oceanográficas llamadas Pesquerías. Estos resultados se publicaron en una serie de informes técnicos y en el artículo de Brandhorst & Castello (1971). Valores de *PP* fueron luego estimados en una serie de campañas realizadas durante 1981 en una sección de la provincia de Buenos Aires (Negri, 1993). Luego siguieron después de 2000 los trabajos de Villafañe *et al.*, (2004 a & b), Schloss *et al.*, (2007) y Garcia *et al.*, (2008); el primero se restringió a una zona costera en la provincia de Chubut y experiencias de mesocosmos y los dos últimos cubrieron zonas de la plataforma y talud continental. Schloss y colegas (2007) estimaron la producción primaria usando el método de oxígeno mientras que García *et al.*, (2008) realizaron experiencias de incubación en cubierta usando la técnica de carbono 14 (^{14}C). Más recientemente Lutz *et al.*, 2010, Segura *et al.*, 2013 y Dogliotti *et al.*, 2014 publicaron estudios de producción primaria en distintas regiones del Mar Argentino en distintas épocas del año usando por primera vez en la región el método de carbono 13 (^{13}C).

Objetivo del trabajo

El objetivo general de este trabajo es presentar las consideraciones teóricas, los aspectos prácticos y los cálculos matemáticos de las mediciones de producción primaria que se llevan a cabo en el INIDEP desde el año 2008. El mismo está organizado en dos informes (Parte I y Parte II). Aquí se presenta el **Protocolo de muestreo de campo y procesamiento de muestras de producción primaria (Parte I)**, cuyo objetivo particular es describir los aspectos prácticos de la técnica de ^{13}C de Hama *et al.*, 1983 con modificaciones (Fernández *et al.*, 2005) utilizada en el INIDEP para medir la producción primaria



de campo a partir de incubaciones *P versus I* a bordo y el posterior procesamiento de las muestras en el laboratorio de Producción Primaria y Bio-toxicidad.

MATERIALES Y MÉTODOS

A continuación, se detalla la lista de materiales requeridos para llevar a cabo las experiencias de PP:

Muestreo y experimentos a bordo:

- balde con cabo,
- embudo para trasvasar el agua del balde,
- Dos bidones de capacidad de 8 litros cubiertos con nylon negro (A y B).

Nota: usamos los de agua mineral de capacidad de 8 litros., medimos el volumen hasta el anillo que puede variar un poco y lo anotamos en el bidón,

- Un bidón de 5 L oscuro cubierto con nylon negro,
- bidón con grifo "C" (> 8L) para trasvasar la muestra de agua e inocular con la solución de carbono 13,
- embudo para transferir la muestra de agua del bidón A al bidón C (exclusivo para manipular la muestra de producción,
- - vial con una solución *enriquecida de bicarbonato de sodio con ^{13}C* ($\text{NaH}^{13}\text{CO}_3$). La solución se prepara en el laboratorio para lograr un enriquecimiento final de ~ 8 % en porcentaje de átomos de carbono 13 (ver Anexo 1 con la explicación de cómo prepararla).
- 24 botellas de policarbonato cuadradas de capacidad de 500 ml,
- - *Caja P vs I*: Caja de acrílico hermética con una iluminación de lámparas de halógeno y lugar para alojar 24 botellas, con un sistema de circulación de agua conectado a un baño termostático (Fig. 2). [La utilizada en el INIDEP fue diseñada y construida por V. Segura].



- mallas de atenuación de la luz,
- planchas de goma negra para colocar arriba de las botellas antes de cerrar la caja P & I evitando así que las botellas floten en la caja,
- probetas plásticas de 500 ml,
- baño termorregulador con circulación de agua (Fig. 2),
- mangueras y conectores para el recorrido del agua,
- bidones de 10 litros con agua destilada (con agregado de ~ 10 ml de lavandina),
- jarra pequeña para remover agua del baño termorregulador,
- bomba de filtración con trampa de vacío,
- sistema de filtración compuesto por: tren de filtración, diez porta filtros de 25 mm, diez vasos de filtración, 10 tapones de silicona y diez pinzas de ajuste,
- mangueras de silicona y conectores para la circulación de agua,
- recipiente reservorio del agua filtrada capacidad igual o superior a 4 litros,
- filtros de fibra de vidrio GF/F de 25 mm de diámetro y 0,7 μm de tamaño de poro marca whatman pre-combustionados a 450 °C durante un periodo de 2 horas para asegurarse que no haya contaminación con materia orgánica
- papeles de aluminio cuadrados pre-combustionados a 450 °C aproximadamente 30 minutos,
- pinzas para manipular los filtros GF/F,
- etiquetas para rotular las muestras,
- horno eléctrico,
- radiómetro esférico (marca: Biospherical QSL-2100) adosado en el mismo un tapón” ad-hoc” especial para encajar en la botella de incubación utilizada para las mediciones (Fig.3),
- botella de policarbonato cuadrada con capacidad de 500 ml llena con agua ultra-pura (utilizada para las mediciones de luz),
- bidón de 5 litros con agua ultra-pura,
- pañuelos tissue,
- planillas para anotar las mediciones de luz dentro de la caja P & I,



- radiómetro coseno PAR (marca: LICOR) con un registrador de datos,
- guantes descartables,
- rollo de papel de aluminio,
- Silica gel,
- desecador de vacío,

-Procesamiento en el laboratorio

- Bandeja de acrílico con placas de pocillos perforados para colocar los filtros para acidificar,
- vaso precipitado con agua ultra-pura,
- vaso precipitado con alcohol etanol,
- pipeta Pasteur,
- Silica gel,
- Ácido clorhídrico puro pro-análisis,
- erlrmeyer con tapa a rosca para conservar el HCL,
- recipiente contenedor grande con tapa para acidificar los filtros,
- caja contenedora con tapa para secar las muestras acidificadas,
- sacabocados de distintos diámetros para cortar los filtros,
- capsulas de estaño 5 mm x 9 mm (marca: Costech),
- microplacas filtrantes de plástico transparentes, de 96 pocillos.

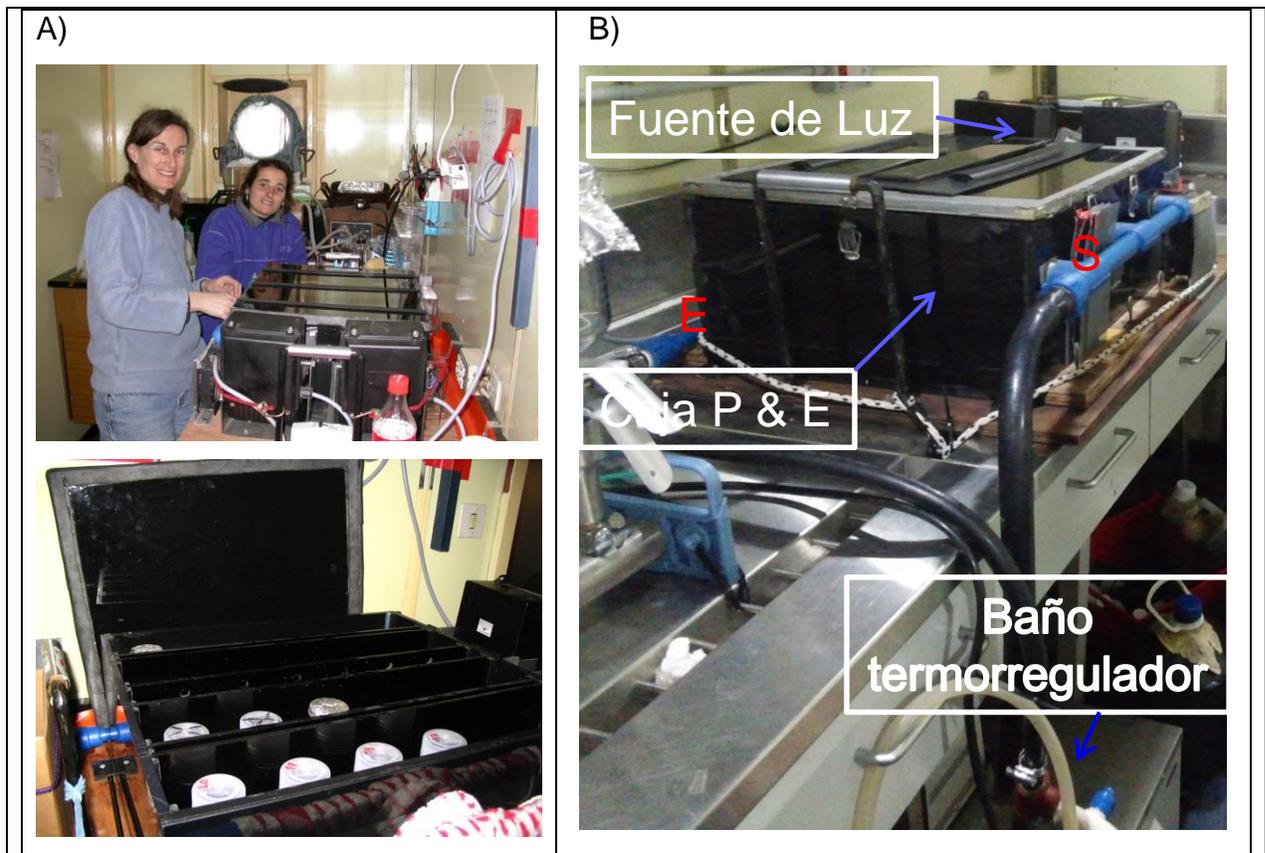


Figura 2. A) Imagen de la caja P & I con las botellas colocadas en su interior, B) Caja P & I conectada con las mangueras de entrada "E" y salida "S" al baño termorregulador.



Figura 3. Radiómetro Biospherical QSL-100

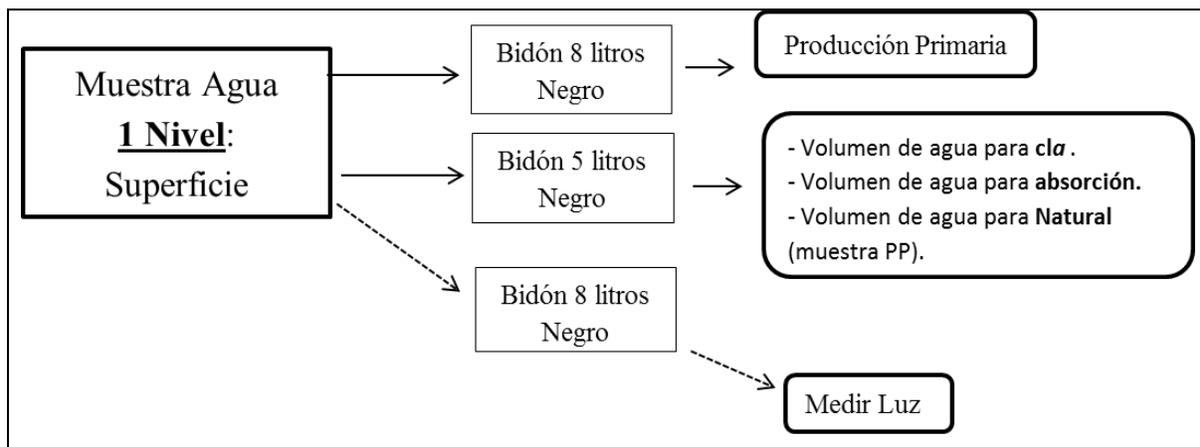


RESULTADOS

A continuación, se detallan cada uno de los pasos que se siguen para realizar las experiencias de producción primaria a bordo de los buques de investigación y el posterior procesamiento de las muestras en el laboratorio de Bio-toxicidad y producción primaria del INIDEP:

1. **Toma de las muestras de agua**

En la estación oceanográfica seleccionada, tomar una muestra de agua de mar de superficie con balde, enjuagar un bidón de 8 litros 3 veces con agua de la estación. Luego llenar el bidón hasta la marca en el cuello que señala el volumen exacto. Repetir este procedimiento con un segundo bidón de al menos 8 litros (no exactos en este caso) y con un bidón de 5 litros oscuro (Fig. 4). La muestra de agua del bidón de 5 litros se va a usar para filtrar y obtener: 1) la muestra “natural” de producción primaria es decir, muestra de agua de mar sin enriquecer con la solución de carbono 13, 2) la muestra de material particulado total y 3) la muestra de clorofila *a*. Estas últimas dos muestras son las llamadas aquí “estimaciones accesorias” y se realizan no solo en superficie sino también en otros niveles de la columna de agua (Fig. 4).



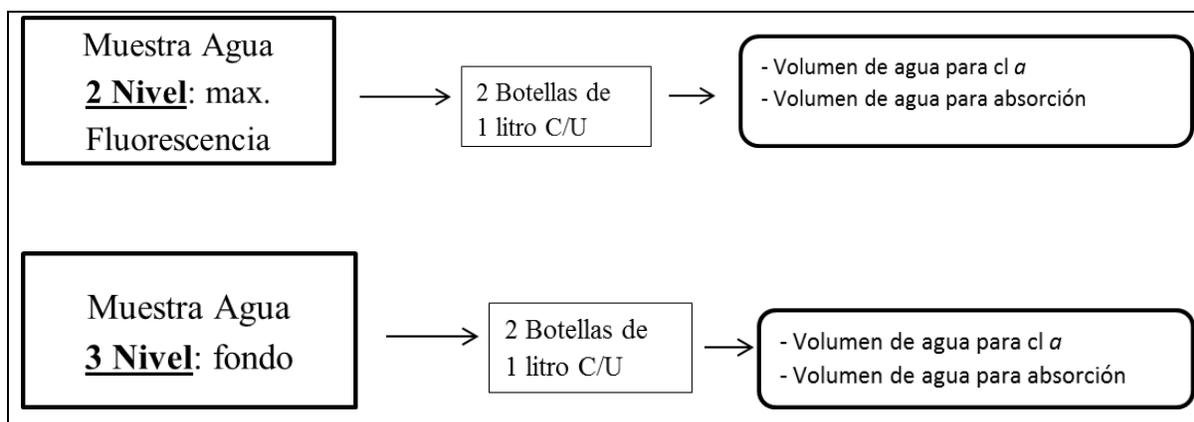


Figura 4. Esquema de las muestras a colectar para estimar las distintas variables a las profundidades de muestreo seleccionadas.

2. ***Incubación de las muestras de producción primaria (PP)***

2.1- Prender el baño termostático 30 minutos antes de realizar la experiencia. Fijar el valor de temperatura del baño con el valor de temperatura superficial del agua de mar en la zona cercana al muestreo utilizando el valor que indica de temperatura el termosalinógrafo. Este paso es fundamental para permitir que el baño termostático llegue a la temperatura cercana a la deseada en el momento de la estación oceanográfica. Nota: una vez en la estación oceanográfica setear baño con el valor de temperatura que marca el CTD para la superficie del mar.

2.2- Llenar el baño termostático con bidones de agua destilada. NOTA: Se necesita más de un bidón de 10 litros para que el agua circule entre el baño y la caja de incubación.

2.3- Sacar el vial de la solución de $\text{NaH}^{13}\text{CO}_3$ del freezer para que se descongele antes de ser usado.

2.4- La muestra de agua de mar tomada con el bidón "A" (8 litros) trasvasarlo por medio de un embudo al bidón con canilla que facilita el llenado de las botellas.



2.5- Inocular con el vial de la solución de $\text{NaH}^{13}\text{CO}_3$ y agitar suavemente para homogeneizar.

2.6- Llenar un total de 16 botellas de policarbonato, previamente rotuladas del número 1 al 15 (botellas “claras”) y la botella “negra”, hasta la marca de 500 ml con la muestra de agua enriquecida con $\text{NaH}^{13}\text{CO}_2$. Las restantes botellas que van dentro de la caja en posiciones específicas están llenas con agua ultrapura, y las tapas tienen la marca de “X”. Estas últimas son botellas de relleno para ocupar los espacios dentro de la caja y contribuir a la atenuación de la luz.

2.7- Colocar todas las botellas dentro de la caja de incubación P & I (Fig. 2), acomodándolas en forma ascendente como muestra el esquema (Fig. 5). Nota: Asegurarse que las botellas estén sumergidas (por encima de la marca de 500 ml) en el agua dentro de la caja.

2.8- Colocar las diferentes mallas de atenuación de luz entre las botellas como indica la figura 5. NOTA: la posición de las mallas de una campaña a otra puede variar dependiendo de la intensidad de las lámparas. El objetivo es cubrir las intensidades bajas y altas sin que se repitan.

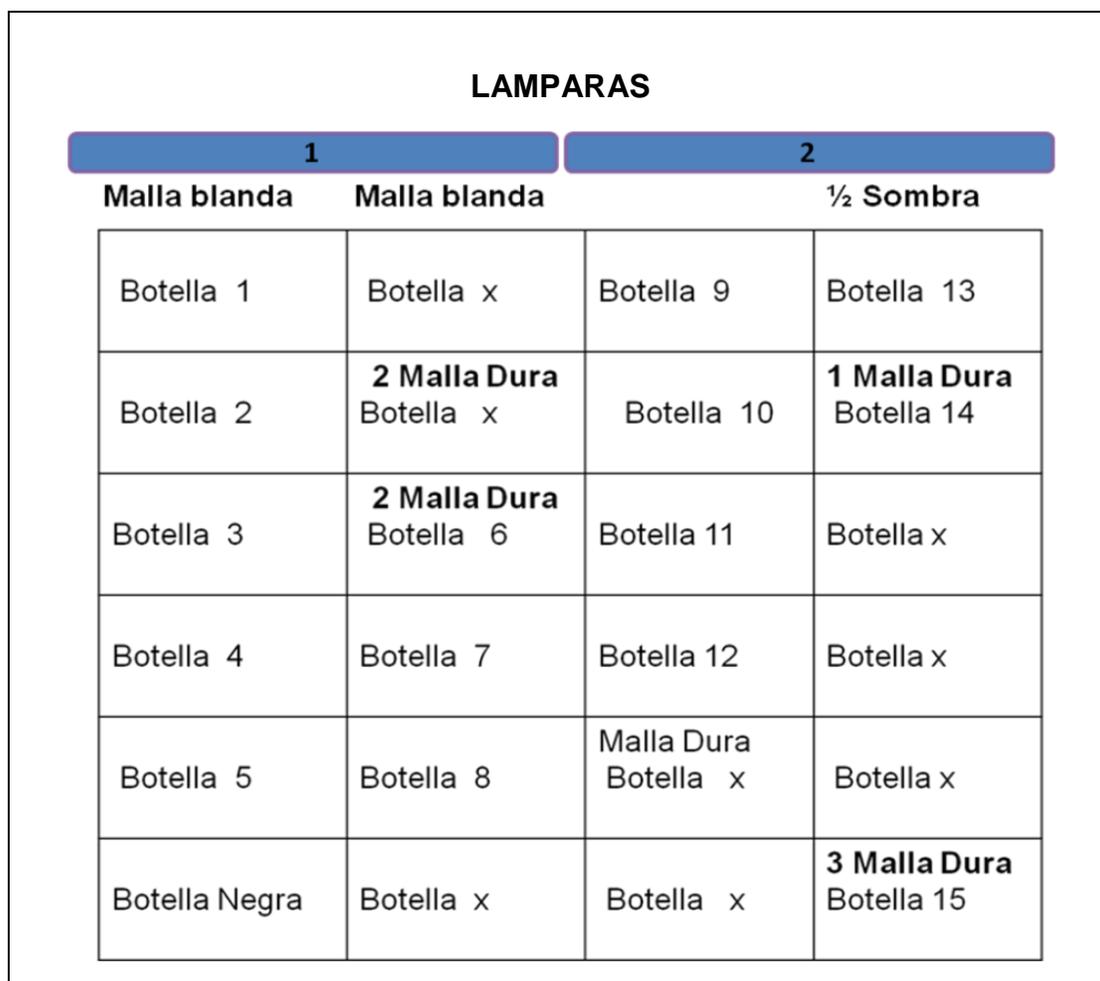


Figura 5. Esquema de caja P & I con las posiciones de las botellas a incubar y de las mallas de atenuación de la luz.

2.9- Poner las planchas de goma negra arriba de las botellas (ayudan a que las botellas no floten dentro de la caja) y cerrar la caja para iniciar la incubación.

2.10- Encender la fuente de luz y luego de 5 minutos anotar la hora de inicio de la experiencia de incubación en la “planilla de luz” e incubar las botellas durante 4 horas.

2.11- Una vez iniciada la incubación tomar del bidón de 5 litros oscuro un volumen de agua con una probeta limpia de 500 ml y filtrar en un filtro pre-combustionado



para obtener la muestra de agua “natural”. Se filtran las muestras de agua a través de filtros de fibra de vidrio GF/F marca Whatman previamente combustionados. Nota: el volumen a filtrar dependerá de la cantidad de material en el agua; idealmente se filtrarán los 500 ml siempre que el tiempo de filtrado no supere los 30 minutos, en caso contrario finalizar la filtración y anotar el volumen filtrado. Esta muestra “natural” ayuda luego a decidir el volumen de filtración de las muestras incubadas. El volumen y el tiempo de filtración va a depender del lugar donde fue colectada la muestra, ej, en una zona costera va a costar más filtrar debido al material en suspensión (detritos). Anotar en la planilla abordo todos los volúmenes filtrados para cada botella.

2.12- Luego de filtrar la muestra “natural” colocarla en un papel de aluminio pre-combustionado y semi abierto, etiquetado con el n° de estación general y la palabra “Natural” y poner en el horno eléctrico sin prender hasta que el resto de las muestras estén filtradas para ser secadas (Fig. 6).

2.13- Luego de transcurrido el tiempo de incubación, apagar la fuente de luz, cortar el paso de agua del baño termorregulador a la caja incubadora y apagar el baño. Abrir la caja y comenzar a sacar las botellas que serán filtradas, girarlas suavemente para homogenizar la muestra.

2.14- Colocar en el tren de filtración los filtros GF/F Whatman pre-combustionados.

2.15- Comenzar a filtrar las botellas desde la 1 hasta la 15. Colocar el volumen deseado a filtrar directamente de la botella utilizando como referencia las marcas de los volúmenes. De esta manera evitamos contaminar con la manipulación de probetas. Posteriormente, filtrar la botella “Negra”, que sí debe medirse en una probeta. Nota: ir vaciando el botellón de agua de desecho a medida que se vaya llenando.

2.16- A medida que finaliza la filtración de cada una de las botellas colocar con una pinza los filtros sobre el papel de aluminio pre-combustionados manteniendo la marca hacia arriba. Los mismos deben estar previamente etiquetados con el n°



de estación general y el nº de botella (Fig. 6). Evitar siempre tocar los filtros (ya sea antes de filtrar o ya con las muestras) y los papeles de aluminio (del lado donde va la muestra) con los dedos.

2.17- Entre muestra y muestra enjuagar las copas de filtración y porta filtros con abundante agua destilada o agua de mar filtrada para evitar que le queden restos de ^{13}C .

2.18- Poner las muestras con el papel de aluminio semi-abierto en el horno eléctrico a temperatura baja o previamente calentado para secar los filtros antes de ser guardados para su posterior procesamiento en el laboratorio (Fig. 6).

2.19- Una vez secos y fríos los filtros, sobre una superficie previamente limpia con alcohol, doblarlos a la mitad con la ayuda de pinzas, sin tocar con los dedos, si es necesario usar guantes (Fig. 6). Cerrar el papel de aluminio de modo que forme un sobrecito, mantener las etiquetas siempre externas y a la vista. Luego envolver todos los filtros pertenecientes a una misma estación en un paquete más grande de papel de aluminio. Rotular con el número de estación, y el código de la campaña.

2.20- Almacenar las muestras abordo dentro de una desecadora o en una lata cubierta con papel de aluminio con silica gel activada (calentando a una temperatura entre 120 y 180 °C para que elimine la humedad que haya absorbido previamente) en su interior (Fig. 7).

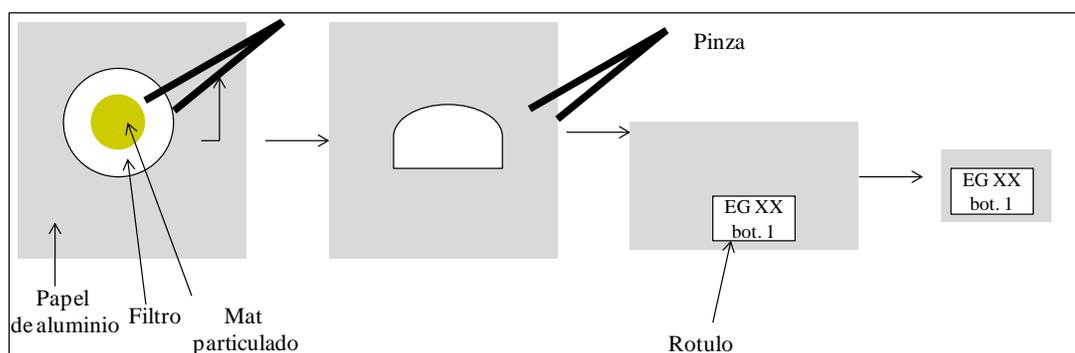




Figura 6. Esquema de la manipulación de los filtros de PP para ser guardados hasta su posterior procesamiento en el laboratorio.

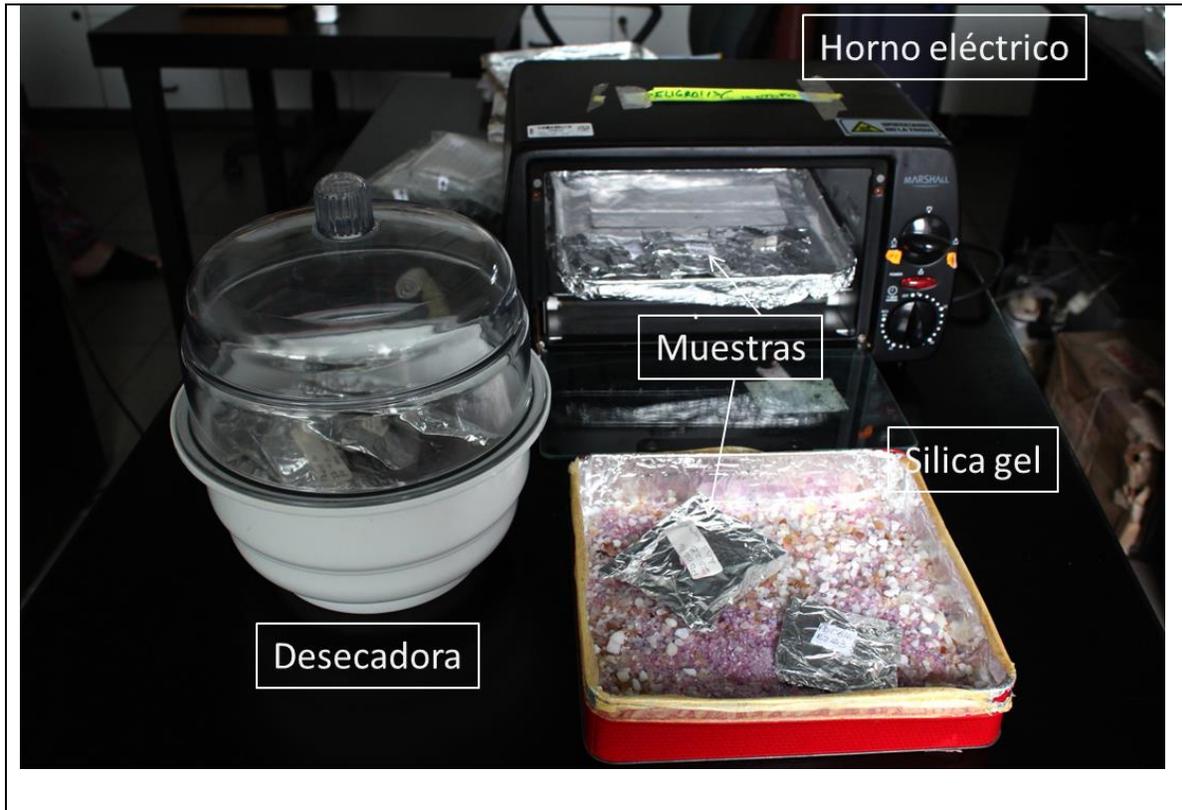


Figura 7. Muestras de las experiencias P & I: A) secándose en el horno eléctrico y B) conservadas en desecadora o lata con silica gel.

3. Lectura de la irradiancia (I) dentro de la caja incubadora

3.1- Al final del día (o cuando haya terminado los experimentos para el día), llenar las botellas de incubación (Naturales y Negra) con el agua guardada en bidón "B" (es decir agua de la estación) y ponerlos en su lugar dentro de la caja P & I (Fig. 5).



3.2-Llenar una botella de policarbonato cuadrada con agua ultra-pura previamente limpia (una botella que solo se use para este fin) y colocar el sensor de luz del radiómetro Biospherical QSL-100 con un tapón especial preparado *ad hoc* para ajustar al cuello de la botella (Fig.3).

3.3- Colocar las mallas de atenuación en la caja *P & I*. NOTA: la posición de las mallas de una campaña a otra puede variar dependiendo de la intensidad de las lámparas. El objetivo es cubrir las intensidades bajas y altas sin que se repitan.

3.4- Medir la irradiancia dentro de la caja de acuerdo a los siguientes pasos:

- comprobar la energía de la batería del radiómetro (tiene un indicador para eso),
- colocar el sensor en modo 'seco' (DRY) y comprobar que mida cero en completa oscuridad. Para esto debe cubrir primero el sensor con un Kimwipe (para evitar rallarlo) y luego con un nylon negro grueso asegúrese de que la lectura sea "cero" en la escala más baja del sensor. En caso contrario, ajustar el valor a cero moviendo la perilla.

- en modo 'seco' registre la intensidad luminosa de las lámparas (en el centro) delante de cada ventana. Nota: las mediciones en modo DRY (fuera de la caja) representan un control del estado de uso de las lámparas. Si hay cambio en la intensidad medida en las mismas se deben cambiar las lámparas.

- en modo húmedo (WET), colocar el radiómetro en la botella con agua ultrapura y colocarla por turno en cada una de las posiciones numeradas dentro de la caja (Fig.5) retirando la correspondiente botella numerada y luego colocarla nuevamente. Así se registra la luz que cada botella de incubación está recibiendo.

- en modo 'seco' vuelva a registrar la intensidad de la luz inmediatamente delante (en el centro) de cada ventana justo delante de las lámparas para registrar si hay algún cambio desde el inicio de las lecturas.

Nota: Anotar en la planilla los valores obtenidos tanto en las posiciones de cada botella (Modo: WET del radiómetro) como fuera de la caja en frente de la fuente de



luz (Modo: DRY del radiómetro). Se obtendrá un gradiente de intensidad de luz (I) en las posiciones de cada botella debido a la atenuación producida por las mismas botellas con agua más la inserción en diferentes posiciones de mallas de atenuación neutras.

4. *Procesamiento de las muestras en el laboratorio*

4.1- Una vez en el laboratorio en tierra, abrir los sobres que contienen los filtros de PP cuidadosamente y colocarlos en placas de acrílicos con poros perforados para permitir la acidificación (Fig. 8 A).

4.2- Los filtros son abiertos con pinzas cuidadosamente dentro de las placas y manipulados con guantes.

4.3- Colocar de 3 a 4 gotas de agua ultra-pura en el centro de los mismos para humedecerlos y así permitir el paso de los vapores de HCl (Fig.8 B).

4.4- Colocar las placas con los filtros dentro del recipiente contenedor junto con el erlenmeyer (abierto) que contiene ácido clorhídrico puro durante un periodo no menor a 4 horas. La exposición a los vapores de HCl (1N) se realiza para eliminar el carbono inorgánico disuelto (DIC) que pueda haber quedado en los mismos, ya que este puede interferir con las mediciones de carbono orgánico particulado.

4.5.- Una vez finalizada la acidificación, pasar la placa de acrílico que contiene los filtros cuidadosamente a un recipiente contenedor con silica gel activada en su interior (Fig. 8 A).

4.6- Dejar secar durante una noche.

4.7- Una vez secos, cortar los filtros con un sacabocado asegurándose que el diámetro del mismo sea mayor que la marca del material de la muestra en el filtro (Fig. 8 C).



4.8- Encapsular los filtros mediante manipulándolos con pinzas dentro de las cápsulas de estaño de tamaño 5 mm x 9 mm (Fig. 8 C y D). Las cápsulas pueden ser también de plata pero NO de aluminio ya que se descomponen luego de la exposición al ácido.

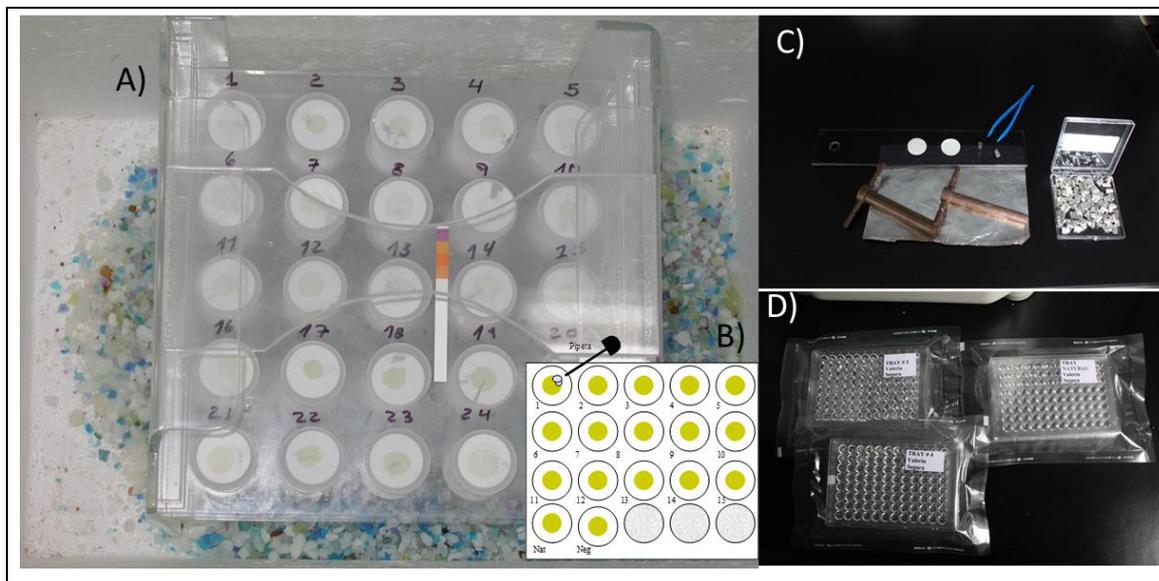


Figura 8. (A y B) Placas de acrílico con poros perforados donde van apoyados los filtros para acidificar, C) Manipulación de filtros para encapsular y D) conservación de las cápsulas en placas para su posterior envío a analizar.

4.9- Colocar las cápsulas de estaño en micro-placas de plástico de 96 pocillos, comenzando por la posición A₁, y anotar en una planilla la posición que le correspondió a cada filtro (FIG. 8 D). Conservar en desecadores hasta su posterior envío para su análisis.

4.10- Enviar las muestras a un laboratorio especializado para el análisis de la cantidad de carbono orgánico particulado (POC) en mg y el porcentaje en átomos de carbono 13 (% ¹³C) por Espectrometría de masas de relaciones isotópicas (IRMS). En el INIDEP las muestras son enviadas al laboratorio *Stable Isotope*



Facility de la Universidad de California -UC Davis University of California para su análisis.

CONSIDERACIONES FINALES

En esta primera parte se presentaron los aspectos prácticos implicados en la estimación de la producción primaria de campo usando un método seguro como es el método de carbono 13. En una segunda parte se presentarán las consideraciones teóricas y cálculos matemáticos necesarios para obtener los parámetros fotosintéticos a partir de las curvas P&I y los valores de producción primaria integrados en la columna de agua.

AGRADECIMIENTOS

Quisiera agradecer a Carla Berghoff por su colaboración en el desarrollo del protocolo “preparación de la solución de bicarbonato de sodio $\text{NaH}^{13}\text{CO}_3$ ” (Anexo 1) y a Nora Montoya por la lectura crítica y útiles sugerencias para mejorar el presente informe.

BIBLIOGRAFÍA

Cushing, D. H. in Sea Fisheries Research (ed. Harden Jones, F. R.)

399–412 (Elek Science, London, 1974).

The effect of El Niño upon the Peruvian anchoveta stock. p. 449-457. In F.A. Richard (ed.) Coastal upwellings. Coastal and Estuarine Sciences 1. Amer. Geophys. Union, Washington, D.C.

Barlow RG, Aiken J, Holligan PM, *et. al.* (2002) Phytoplankton pigment and absorption characteristics along meridional transects in the Atlantic Ocean. Deep Sea Res. 47: 637-660.



- Brandhorst, W & Castello JP. (1971). Evaluación de los recursos de anchoíta (*Engraulis anchoita*) frente a la Argentina y Uruguay. Serie Inf. Téc. 29: 1-63.
- Behrenfeld, M. & Falkowski, PG. (1997). Photosynthetic rates derived from satellite-based chlorophyll concentration. Limnol. Oceanogr. 42(1): 1-20.
- Cushing, 1982. Climate and fisheries. Academic Press, London, 373 p
- Dogliotti AI, Lutz VA, Segura, V. (2014). Estimation of primary production in the southern Argentine continental shelf and shelf-break regions using field and remote sensing data. Remote Sens Environ. 140: 497-508.
- El-Sayed, SZ. (1964). Productivity studies along the Argentine coast, Drake passage and Wedell sea, Texas A&M University. The department of Oceanography and Meteorology, Texas. Semi-Annual Report. National Science Foundation G-21444.
- El-Sayed, SZ. (1968). On the productivity of the Southwest Atlantic Ocean and the waters west of the Antarctic Peninsula. Antarctic Res Ser 2: 15-47.
- Falkowski, PG. (2002). The ocean's invisible forest. Scientific American: 54-61.
- Falkowski, PG., Laws EA, *et al.* (2003). Phytoplankton and their role in primary, new, and export production. Ocean biogeochemistry. The role of the ocean carbon cycle in global change. M. J. R. Fasham. Berlin, Springer-Verlag: 99-121.
- Falkowski PG. & Raven, JA. (1997). Aquatic photosynthesis. Blackwell Science UK 375 p.
- Fernández, C., P. Raimbault, *et al.* (2005). An estimation of annual new production and carbon fluxes in the northeast Atlantic Ocean during 2001. J. Geophys. Res. 110.
- Frouin, R. & Iacobellis, SF. (2002). Influence of phytoplankton on the global radiation budget. J. Geophys. Res..107: DOI: 10.1029/2001JD000562.



- Garcia VMT, Garcia CAE, *et.al.* (2008). Environmental factors controlling the phytoplankton blooms at the Patagonia shelf-break in spring. *Deep Sea Res* 55: 1150-1166.
- Hama T, Miyazaki T, *et.al.* (1983). Measurement of Photosynthetic Production of a marine Phytoplankton population Using a Stable ^{13}C Isotope. *Mar Biol* 73: 31-36.
- Longhurst A, Sathyendranath S, *et.al.* (1995). An estimate of global primary production in the ocean from satellite radiometer data. *J. Plankton Res.* 17:1245-1271.
- Lutz VA, Segura V, *et.al.* (2010). Primary Production in the Argentine Sea during spring estimated by field and satellite models. *J Plankton Res* 32:181-195.
- Mandelli, EF (1965). Contribución al conocimiento de la producción orgánica primaria en aguas Sub-Antárticas (Océano Atlántico Sud-Occidental). *Suplemento 37*: 399-407.
- Mandelli, EF & Orlando AM (1966). La producción orgánica primaria y las características fisicoquímicas de la corriente de las Malvinas. *Bol Ser Hidrogr Nav* 3(3): 185-196.
- Marañón E, Holligan PM, *et.al.* (2000). Basin-scale variability of phytoplankton biomass, production and growth in the Atlantic Ocean. *Deep Sea Res.* 47: 825-857.
- Negri RN. (1993). Seminario taller sobre la dinámica marina y su impacto en la productividad de las regiones frontales del Mar Argentino. *INIDEP Inf. Téc.* 1:7.
- Parsons, TR., Maita, Y., Lalli, CM. (1984). *A Manual of Chemical and Biological Methods for Seawater Analysis*, Pergamon Press Ltd., ISBN 0-08-030287-4, Oxford, United Kingdom.
- Platt, T., Lewis, M., *et al.* (1984). Thermodynamics of the pelagic ecosystem: elementary closure conditions for biological production in the open ocean. *Flows of energy and materials in marine ecosystems*. M. J. R. Fasham. New York, Plenum Publishing Corporation: 49-84.



- Platt, T., Fuentes-Yaco, C., *et al.* (2003). Spring algal bloom and larval fish survival. *Nature* 423.
- Schloss IR, Ferreyra ME, *et.al.* (2007). Role of plankton communities in sea-air variation in pCO₂ in the SW Atlantic Ocean. *Mar Ecol Prog Ser* 332: 93-106.
- Segura V, Lutz VA, *et.al.* (2013). Phytoplankton Types and primary production in the Argentine Sea. *Mar Ecol Prog. Ser.* 491:15-31.
- Segura, V (2013). Variaciones en la producción primaria en relación con los distintos Tipos Funcionales del fitoplancton en el Mar Argentino Tesis doctoral.
- Slawyk, G., Y. Collos, *et al.* (1977). The use of the ¹³C y ¹⁵N isotopes for the simultaneous measurement of carbon and nitrogen turnover rates in marine phytoplankton. *Limnol. Oceanogr.* 22: 925-932.
- Steeman-Nielsen, E. (1952). The Use of Radioactive Carbon (¹⁴C) for Measuring Organic Production in the Sea. *Journal of Du Conseil International Pour l'Exploration de la Mer*, vol.18, pp.117-140.
- Villafañe VE, Barbieri ES, Helbling EW (2004 a). Annual patterns of ultraviolet radiation effects on temperate marine phytoplankton off Patagonia, Argentina. *J. Plankton Res.* 26: 167-174.
- Villafañe VE, Marcoval A, Helbling EW (2004 b). Photosynthesis versus irradiance characteristics in phytoplankton assemblages off Patagonia (Argentina): temporal variability and solar UVR effects. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 284: 23-34.



Anexo 1: Preparación de la solución de $\text{NaH}^{13}\text{CO}_3$

A) Previo a la preparación de la solución

i) Limpiar y preparar:

- vaso precipitado pequeño de volumen: 50 ml.
- cuchara/espátula
- matraz calibrado de 100 ml
- vaso de precipitado de 150-200 ml
- probeta con pico vertedor (conviene que sea de un volumen similar al del volumen de la solución a preparar) con agua ultrapura recién preparada.
- pipeta de 1 o 2 ml para adicionar las últimas gotas para enrazar
- viales (limpiar bien con agua destilada y dejar secar muy bien! tener alguno de más por si fuera necesario)

ii) conocer el volumen de enrase del matraz calibrado

iii) controlar que esté bien limpio el plato de la balanza para no contaminar las muestras

iv) tener la probeta con pico vertedor con agua ultrapura recién preparada

v) parafilm cortado en tiritas para cerrado de los viales

- etiquetas rotuladas para los viales, en las que se deje indicado:
 - o SOLUCIÓN DE ^{13}C
 - o CONCENTRACION: _____ mmol/ml
 - o Fecha de preparación: ___/___/___

B) Pesadas de bicarbonato de ^{13}C :

En un vaso precipitado previamente pesado pesar la cantidad establecida de ^{13}C . para ello:

- 1) una vez pesado el vaso precipitado, (Pvaso) anotar el peso y tarar la balanza
- 2) anotar el valor de ^{13}C pesado (P ^{13}C 'pesado')

C) Preparación de la solución:

Una vez colocado el ^{13}C en el vaso de precipitado ** agregar de a poco (con una pipeta o probeta***) cierta cantidad de agua ultrapura**** y agitar suavemente hasta lograr una completa disolución*****. Una medida visual para ello es ver que la solución cambia de opalescente a traslúcida.

D) trasvasar la solución al matraz calibrado y enrazar con el resto del agua ultrapura*****.

E) Cálculo de concentración:

Siguiendo con el mismo ejemplo, se trasvasa la solución a un matraz de 100 ml el cual está calibrado en el aforo a 99.8526 ml. Asimismo calcula el número de moles pesados a partir de la relación entre el P ^{13}C corregido / PM ^{13}C = 1.8474g/ 84.98 g/mol = 0.021739 mol.



Por lo tanto, la concentración en milimoles es $0.021739 \text{ mmol}/99.8526 \text{ ml} * 1000 = 0.2177 \text{ mmol/ml}$.

** es conveniente que 1) sea un vaso de precipitado y 2) tenga menor volumen que el de la solución a preparar ya que de este modo se facilita la disolución y posterior trasvase de la solución

*** es conveniente que sea graduada para ir teniendo una idea de cuánta agua se fue agregando

**** es importante no colocar toda la cantidad de agua total para la preparación de la solución ya que luego se trasvasará y enrasará en un matraz.

***** ir agitando la solución y si no se disuelve totalmente, porque quedan conglomerados de bicarbonato de sodio, se puede apoyar el recipiente sobre la mano para darle un poco de calor y favorecer la disolución.

***** Tener en cuenta que para que el enlace sea correcto el menisco debe de estar por arriba del aforo.