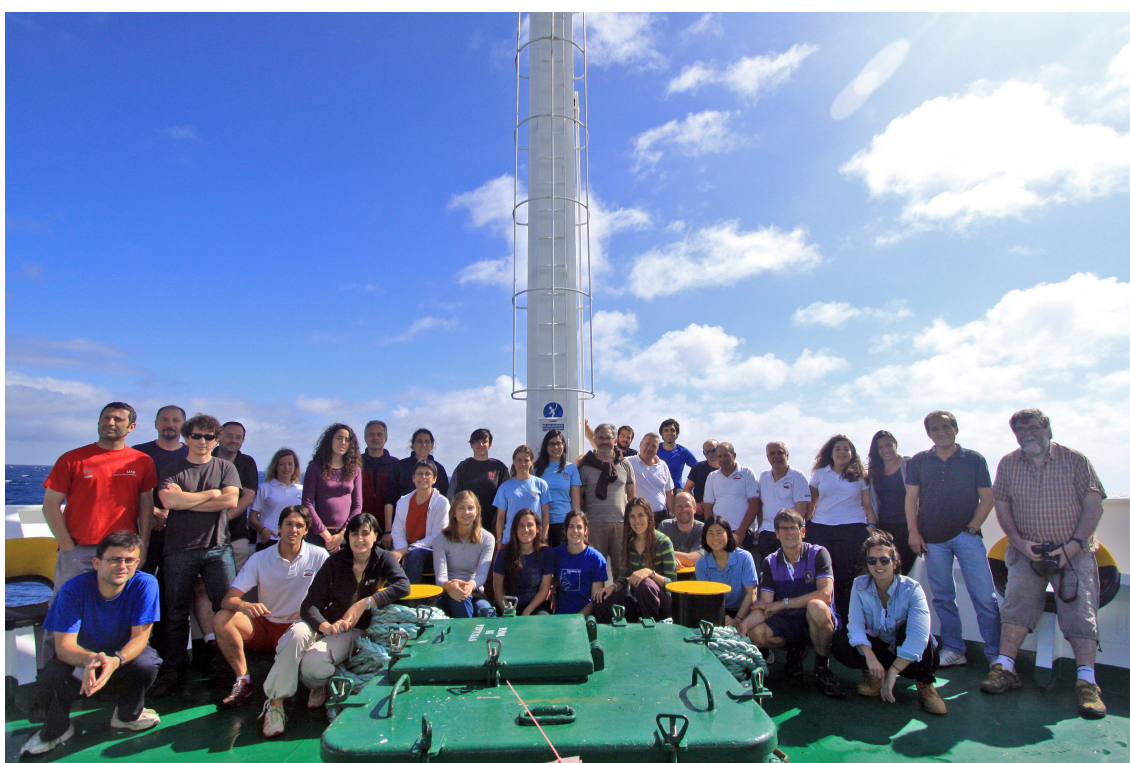


Informe de la Campaña “HOTMIX”

*Dark-ocean mass boundaries and mixing zones as "hot-spots"
of biodiversity and biogeochemical fluxes across the
Mediterranean Sea and eastern north Atlantic*



HOTMIX	
"Hot-spots" of biodiversity and biogeochemical fluxes	
<i>Jefe científico:</i>	Javier Arístegui
<i>Campo de Investigación:</i>	Oceanografía
<i>Organismos participantes:</i>	ULPGC, IIM (CSIC), ICM (CSIC), IEO, Uni. Granada, Uni. Vienna, M.I.O (France), NIOZ
<i>Zona de estudio:</i>	Mar Mediterráneo y Corriente de Canarias
<i>Referencia:</i>	CTM2011-30010-C02
<i>Fecha:</i>	26 Abril- 1 Junio, 2014

CIENTÍFICOS PARTICIPANTES EN LA CAMPAÑA HOTMIX

	APELLIDOS	NOMBRE	INSTITUCIÓN
1	Álvarez Rodríguez	Marta	IEO - A Coruña
2	Álvarez Salgado	Xosé Antón	IIM-CSIC
3	Amano	Chie	Univ. Vienna
4	Aristegui Ruiz	Javier	ULPGC
5	Baños Cerón	Isabel	ULPGC
6	Boekel	Herman	NIOZ
7	Cortés Greus	Pau	ICM-CSIC
8	Dugenne	Mathilde	M.I.O
9	Emilianov Kolomitski	Mikhail	ICM-CSIC
10	Espino Caballero	Minerva	ULPGC
11	Gasol i Piqué	Josep M	ICM-CSIC
12	Gomez Consarnau	Laura	ICM-CSIC
13	Hernández Hernández	Nauzet	ULPGC
14	Marrase Peña	Maria Celia	ICM-CSIC
15	Martínez Pérez	Alba María	IIM-CSIC
16	Nieto Cid	María del Mar	IIM-CSIC
17	Pérez Mazuecos	Ignacio	Univ. Granada
18	Reinthalder	Thomas	Univ. Vienna
19	San León Bartolomé	Henar	IEO - A Coruña
20	Serrano Catalá	María Teresa	Univ. Granada
21	Vieitez dos Santos	Vanesa	IIM-CSIC
22	Zamanillo Campos	Marina	ICM-CSIC

Introducción

El objetivo principal del proyecto HOTMIX es estudiar la influencia de las zonas de mezcla entre masas de agua sobre el metabolismo y la biodiversidad de las comunidades microbianas y su impacto sobre los flujos biogeoquímicos en el océano profundo. El proyecto se desarrolla en el Mar Mediterráneo como paradigma de laboratorio experimental por sus características dinámicas con tiempos de renovación un orden de magnitud menor que en océano abierto (de 11 a 100 años). Para ello se ha seguido la evolución del Agua Intermedia Levantina (LIW), desde su zona de formación en la cuenca oriental del Mar Mediterráneo hasta su salida por el Estrecho de Gibraltar, tránsito en el que se mezcla con las aguas superficiales de origen Atlántico y las aguas profundas formadas tanto en la cuenca oriental (en los mares Adriático y Egeo) como en la occidental (Golfo de León). Igualmente, se han estudiado los procesos de mezcla de la LIW con el Agua Central del Noreste Atlántico (ACNAE) durante su hundimiento en el Golfo de Cádiz, para formar el Agua Mediterránea del Golfo de Cádiz (MOW), así como su expansión en la región oriental del Océano Atlántico, donde se mezcla con aguas procedentes de altas latitudes del Atlántico Norte como el Agua Modal Subpolar (SPMW) y el Agua de Labrador (LSW). Se han reproducido las condiciones “in situ” de temperatura, pH y presión hidrostática de las distintas zonas de transición entre masas de agua para estudiar el metabolismo microbiano mediante la utilización de técnicas novedosas en condiciones de presurización. Se ha estudiado la relación de la diversidad y el metabolismo microbiano con la composición elemental y molecular de la materia orgánica presente en las diferentes masas de agua. Finalmente, se compararán estimas ecológicas de tasas metabólicas con aproximaciones geoquímicas basadas en el análisis multiparamétrico de masas de agua (OMP) y estimaciones de la edad a partir de trazadores transitorios, para contribuir a esclarecer la paradoja del desequilibrio entre fuentes y sumideros de carbono en el Mar Mediterráneo.

El proyecto reúne expertos, líderes en su campo, en las áreas de oceanografía, ecología microbiana, química marina y biogeoquímica, de 5 centros nacionales (ULPGC, IIM-CSIC, ICM-CSIC, IEO y Universidad de Granada) y dos centros extranjeros (Universidad de Viena y el Mediterranean Institute of Oceanography, Marseille), con el fin de abordar un estudio integrado de ecosistemas y biogeoquímica de estas características.

La hipótesis de partida en la que se basa este proyecto es que las zonas de interfase y mezcla entre masas de agua constituyen centros de acumulación y remineralización de materia orgánica (“hot-spots”), con comunidades de procariotas distintas de las aguas circundantes y con una mayor actividad microbiana. Estas regiones contribuirían de forma esencial a las fuentes y sumideros de carbono, y por tanto a los balances metabólicos, en el océano profundo.

Consecuentemente, el objetivo principal del estudio que proponemos es entender la influencia de estas regiones sobre el ciclo global del carbono en el océano oscuro. Para ello, abordamos, desde un punto de vista mecanicista, la interacción entre función y diversidad en las redes tróficas microbianas, bajo situaciones ambientales variadas (a nivel de estructura hidrodinámica y disponibilidad de materia orgánica) y reproduciendo las condiciones “in situ” (presión y temperatura), en regiones de interfase y mezcla entre

masas de agua distintas, tanto en la zona mesopelágica como batipelágica del Mar Mediterráneo y Atlántico Nororiental.

Con este fin llevamos a cabo una campana oceanográfica a lo largo de todo el Mar Mediterráneo, siguiendo la evolución del agua intermedia Levantina (LIW) hasta su disolución en el Atlántico. A lo largo de este recorrido hemos estudiado la interacción del LIW con diferentes masas de agua intermedias y profundas.

Los objetivos específicos de la campaña eran:

- Caracterizar la materia orgánica disuelta y particulada en suspensión a nivel molecular
- Determinar la estructura y composición de la red trófica microbiana, tanto en la zona epipelágica (incluyendo fitoplancton) como en el océano oscuro, y su relación con la presencia de agregados y calidad de la materia orgánica
- Cuantificar la contribución de la demanda de carbono microbiano en las zonas de frente y mezcla de masas de agua respecto al total en la columna de agua.
- Comparar la actividad de procariotas (producción heterotrófica y actividades enzimáticas) en condiciones presurizadas y despresurizadas
- Describir la variabilidad en la diversidad procariota a lo largo del Mar Mediterráneo y sus zonas de interfase, mediante pirosecuenciación 454 de 16rNA-tags
- Comparar las medidas de demanda de carbono con estimas geoquímicas de utilización aparente de oxígeno en las regiones de estudio

Narrativa de la campaña

La campaña, a bordo del “B/O Sarmiento de Gamboa”, comenzó en el Puerto de Heraklion (Creta) el 27 de Abril de 2014 y finalizó en el Puerto de Las Palmas el 30 de Mayo de 2014. Anteriormente, el barco realizó un tránsito desde el Puerto de Vigo a Creta, de 10 días de duración, a lo largo del cual se probaron algunos equipos instalados a bordo y se realizaron 3 estaciones oceanográficas distribuidas en aguas del Atlántico, y las cuencas occidental y oriental del Mar Mediterráneo. Se aprovechó este tránsito para llevar a bordo a 6 estudiantes de los Máster de Oceanografía de las Facultades de Ciencias del Mar de Vigo, Las Palmas y Cádiz, en coordinación con las universidades implicadas, como ejercicio de prácticas de mar.

Se llevaron a cabo 29 estaciones oceanográficas (se decidió prescindir de la estación nº 30), sin ningún incidente importante (ver mapa de estaciones en la figuras siguientes). Cada estación comenzaba con un CTD-roseta a primera hora de la mañana (sobre las 7 am) y finalizaba por la tarde (sobre las 16 pm), utilizando el resto del día para navegar entre estaciones. En cada estación se lanzaban 2-4 rosetas para tomar muestras de agua para el estudio de propiedades biogeoquímicas, abundancias, biodiversidad y actividades de los microorganismos. Asimismo, en muchas estaciones (como viene recogido en los informes parciales) se tomaron muestras de agua para llevar a cabo diferentes tipos de experimentos a lo largo del recorrido de la campaña. En algunas

estaciones se lanzaba una red WP2 para toma de muestras de zooplancton (ver tabla siguiente).

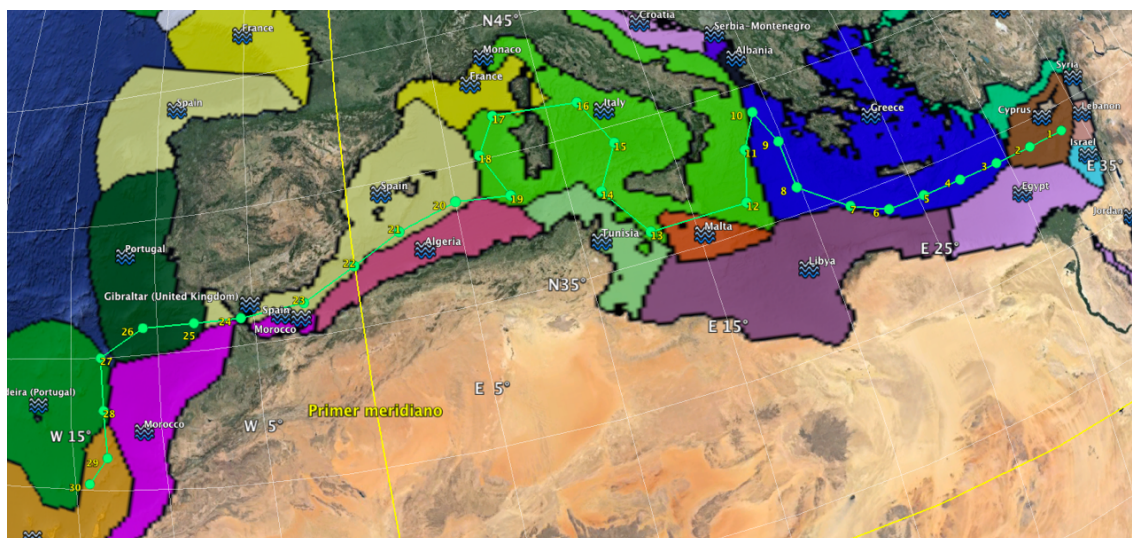


Figura: Plan de campaña (teórico) sobre mapa de google mostrando las zonas de aguas territoriales de los diferentes países del Mediterráneo.

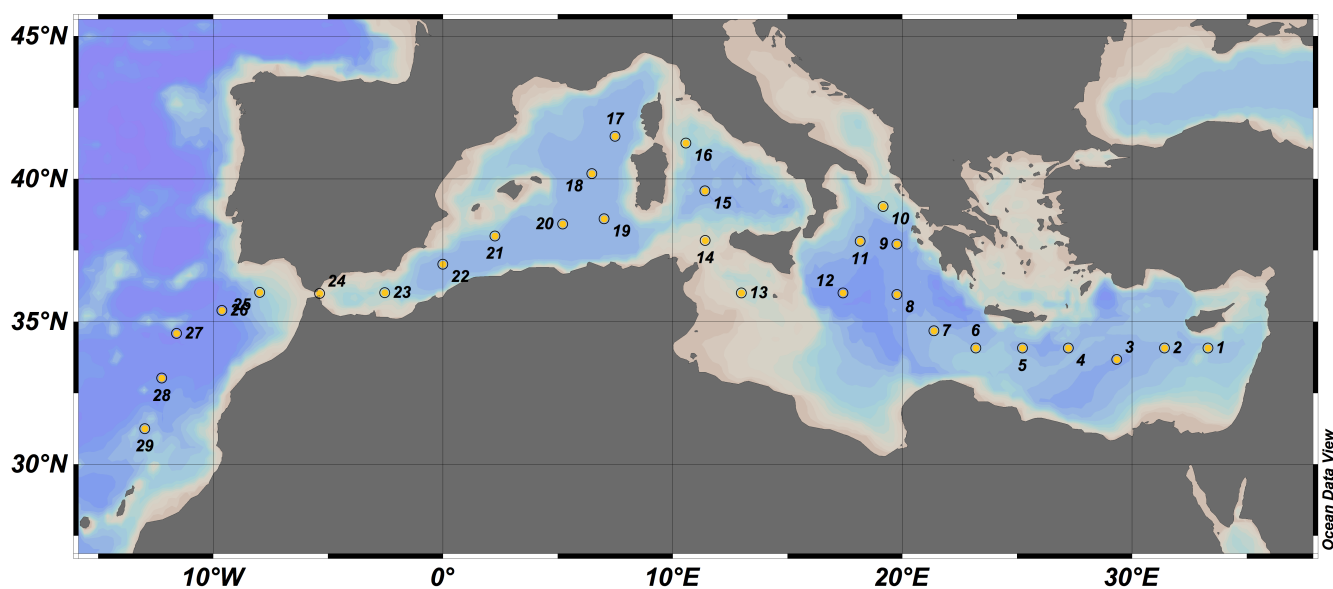


Figura: Plan de campaña con estaciones (reales) sobre mapa con batimetría de fondo.

Tabla 1: Lista de estaciones, con maniobras de CTD y Redes WP2

St.#	CTD#	CTD range	Lat.N(deg)	Lat.N(min)	Lon.E/W(deg)	Lon.E/W(min)	Depth(m)	Pesca(0-100)	Pesca(0-300)
1	1	0-Fondo	34	4.220	33	30.500	2240	x	
	2	0-150							
	3	0-200							
2	1	0-Fondo	34	4.355	31	24.748	2521	x	
	2	0-140							
	3	0-2000							
	+exp								
3	1	0-Fondo	33	39.967	29	20.641	2873	x	
	2	0-235							
4	1	0-Fondo	34	34.360	27	13.547	2460	x	
	2	0-140							
	3	0-550							
5	1	0-Fondo	34	4.369	25	13.857	2762	x	
	2	0-130							
	3	0-2000							
6	1	0-Fondo	34	4.372	23	12.494	2589	x	
	2	0-110							
	3	0-705							
7	1	0-Fondo	34	40.367	21	22.34	2431	x	
	2	0-150							
	3	0-600							
8	1	0-Fondo	35	57.077	19	46.318	3167	x	
	2	0-120							
	3	0-500							
9	1	0-Fondo	37	42.917	19	46.313	3574	x	
	2	0-120							
	3	0-2000							
	+exp								
10	1	0-Fondo	30	1.567	19	9.676	1147	x	
	2	0-135							
11	0/noche	0-100	37	48.839	18	10.412	2715	x	
	1	0-Fondo						x	
	2	0-120							
	3	0-500							
12	1	0-Fondo	36	0.006	17	24.995	3181	x	
	2	0-150							
	3	0-800							
13	1	0-Fondo	36	0.004	13	0.03	1032	x	
14	1	0-Fondo	37	50.723	11	25.126	568	x	
15	1	0-Fondo	39	34.743	11	24.805	3175	x	
	2	0-120							
	3	0-650							
16	1	0-Fondo	41	14.981	10	35.018	1417	x	
	2	0-1407							
17	1	0-Fondo	41	29.369	7	29.51	2851	x	
	2	0-70							
	3	0-2000							
	4	0-2000							
	5	0-2000							
	+exp								
18	1	0-Fondo	40	10.958	6	29.488	2891	x	x
	2	0-90							
	3	0-600							
19	1	0-Fondo	38	36.009	7	1.5	2895	x	
	2	0-90							
	3	0-600							
20	0/noche	0-200	38	24.766	5	12.933	2871	x	
	1	0-Fondo						x	x
	2	0-100							
	3	0-600							
21	1	0-Fondo	38	0	2	15.964	2797	x	
	2	0-100							
	3	0-700							
22	1	0-Fondo	37	0.608	0	0	2742	x	
	2	0-200							
	3	0-2000							
	+exp								
23	1	0-Fondo	36	0.904	2	31.513	1362	x	x
	2	0-150							
24	1	0-Fondo	35	59.189	5	22.058	872		x
	2	0-100							
25	1	0-Fondo	36	0.998	7	58.033	1457	x	
	2	0-110							
	3	0-1050							
26	1	0-Fondo	35	23.168	9	36.901	3528	x	
	2	0-110							
	3	0-800							
27	0/noche	0-200	34	35.035	11	35.159	4548	x	
	1	0-Fondo							x
	2	0-110							
	3	0-750							
28	1	0-Fondo	33	1.289	12	14.428	4090	x	
	2	0-110							
	3	0-1000							
29	1	0-Fondo	31	15007	12	58586	3218	x	
	2	0-110							
	3	0-800							

Tabla 2: Lista de los parámetros principales analizados en la campaña

Acrónimos:

IEO: Instituto Español de Oceanografía, Coruña

IIM: Instituto de Investigaciones Marinas, Vigo (Consejo Superior de Investigaciones Científicas)

ICM: Instituto de Ciencias del Mar, Barcelona (Consejo Superior de Investigaciones Científicas)

ULPGC: Universidad de Las Palmas de Gran Canaria

GEOMAR: Helmholtz Centre for Ocean Research, Kiel

Parámetro	Partner
Presión (CTD)	ICM-CSIC
Temperatura (CTD)	ICM-CSIC
Salinidad (CTD/Salinómetro)	IEO/ICM-CSIC
ADCP, LADCP	ICM-CSIC
Oxígeno (CTD/Winkler)	IEO
Turbidez (CTD)	ICM-CSIC
Back Scattering (Ecosonda)	ULPGC
Nutrientes (NO ₂ , NO ₃ , PO ₃ , SiO ₂)	IIM-CSIC
Sistema del Carbono (DIC, alcalinidad total, pH, pCO ₂)	IEO
CFC-Trazadores	IEO/GEOMAR
Biogases	IEO/GEOMAR
Compuestos orgánicos volátiles, VOC	ICM-CSIC
Carbono orgánico total, TOC	IIM-CSIC
Materia orgánica disuelta coloreada, CDOM, FDOM	IIM-CSIC
Carbono orgánico particulado, POM	ULPGC
Partículas Exopoliméricas Transparentes, TEPS	Univ Granada
Clorofila a (CTD/Fluorescencia)	ULPGC
Pigmentos (HPLC)	IIM-CSIC
Abundancia de fitoplancton	ULPGC/Univ. Marseille
Abundancia de virus	ICM-CSIC
Abundancia bacteriana	ULPGC/
Rodopsina, Bacterioclorofila	ICM-CSIC
Producción bacteriana	ICM-CSIC
Producción bacteriana presurizada (HPS)	Univ. Vienna
Actividad enzimática presurizada (HPS)	Univ. Vienna
Respiración microbiana	ULPGC
Actividad enzimática respiratoria (ETS)	ULPGC
Fijación de N ₂	ULPGC
ADN	ICM-CSIC
Microbioma de Zooplancton	ICM-CSIC

Procesado de Datos CTD, ADCP y LADCP

(Mikhail Emelianov. DOFT ICM CSIC mikhail@icm.csic.es)

La descripción técnica de los equipos, problemas encontrados y eventos realizados durante su funcionamiento se encuentran en el Informe Técnico de la UTM.

1. CTD

El muestreo de la columna de agua se realizó con un CTD SBE 911 +, por lo tanto para la adquisición de datos y su procesamiento se usa el respectivo software de SeaBird: el programa “Seasave” (SeaSave Win 32, ver.7.22) para la adquisición y el programa “SBE Data Processing” (ver. 7.22e) para el tratamiento de datos. El algoritmo general de procesamiento de datos consistía en 2 fases:

La 1ª fase era el procesamiento con el paquete de programas “SBE Data Processing” y la 2ª fase era la visualización de resultados obtenidos con el paquete “Ocean Data View”.

Después de cada nuevo “cast” profundo hasta el fondo (Fig. 1) se actualizaba el transecto de los campos termohalinos, del oxígeno disuelto y curvas Theta,S a lo largo del trayecto principal de la campaña (Fig.2)

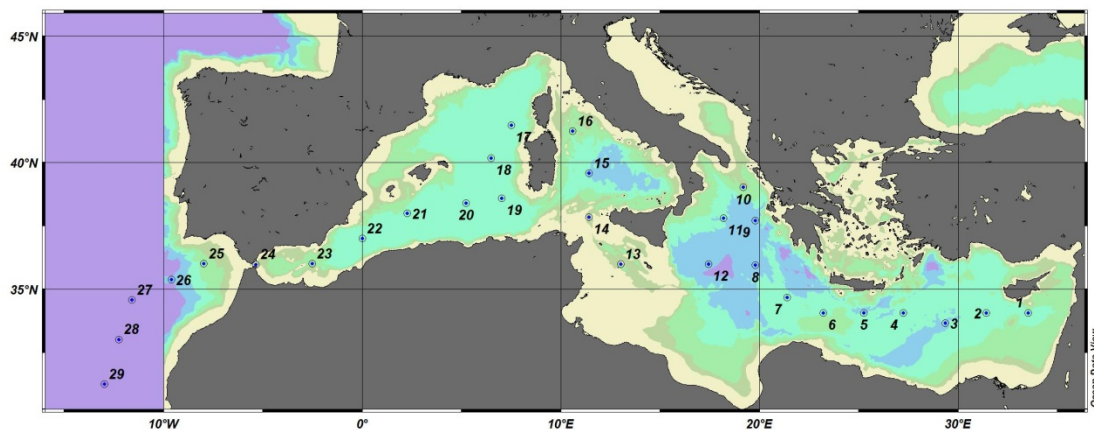


Fig.1. Mapa de estaciones CTD

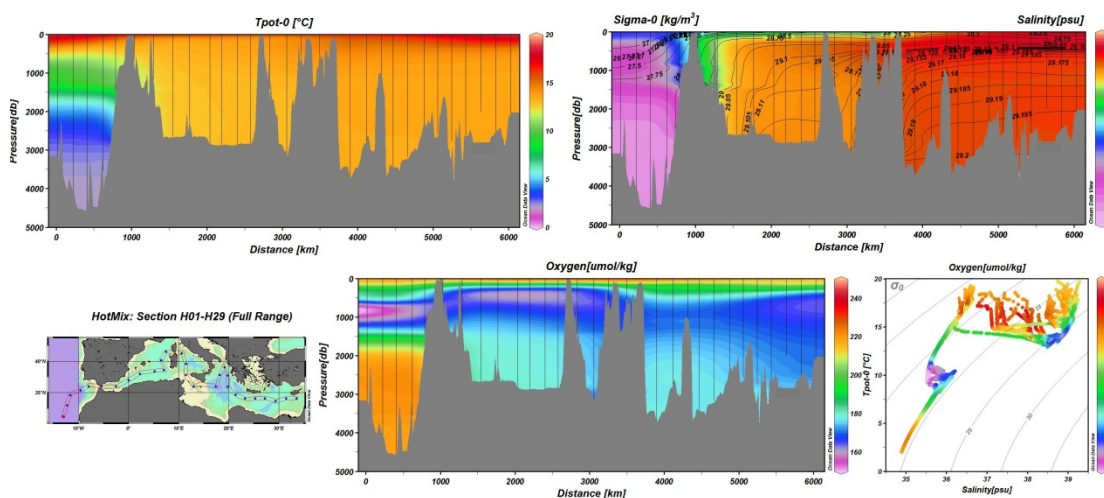


Fig.2. Transecto “Hotmix”

2. ADCP

Para la adquisición de datos el ADCP “Ocean Surveyor” de 75 khz estaba puesto en el modo “Narrow band” con 100 celdas por 8 metros cada una. Los datos fueron adquiridos con el paquete de programas VmDAS (Vessel mounted Data Acquisition System, ver.1.44). El preprocesado de datos fue realizado con el software CODAS (Common Ocean Data Access System) de la Universidad de Hawaii (University of Hawaii Data Acquisition System). Durante el pre-proceso estaba controlada la calibración del ADCP (bottomtrack y watertrack), la calidad de datos adquiridos mediante la visualización de los ficheros LTA (Long Average Time) georeferenciados y promediados cada 5 minutos (Fig.3a,b) y generación de los ficheros contouruv.mat y contourxy.mat que se utilizan en el procesamiento de datos adquiridos con el LADCP (Lowered Acoustic Current Profiler). La calibración y “la limpieza” final de los datos adquiridos será realizada en la fase de postproceso.

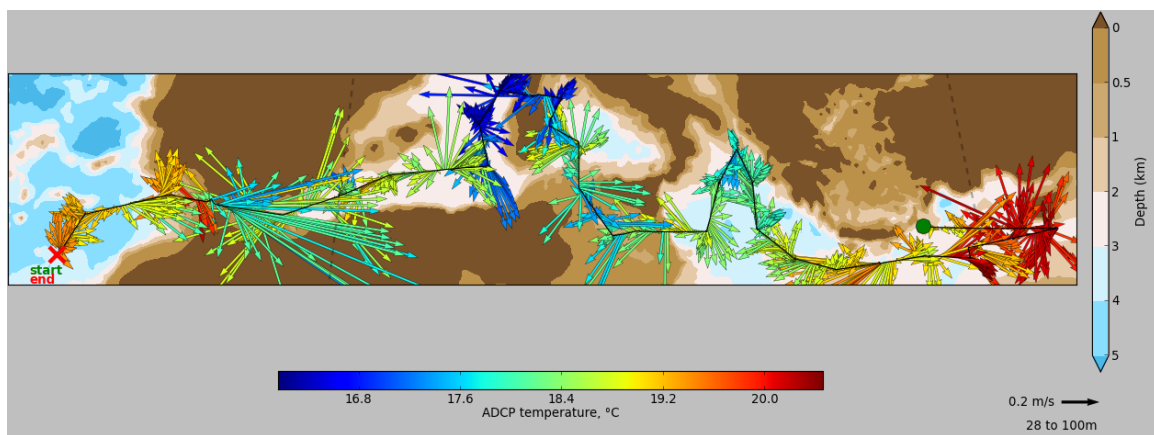


Fig.3a. Vectores de velocidad (datos brutos) en la capa superficial adquiridos durante la campaña.

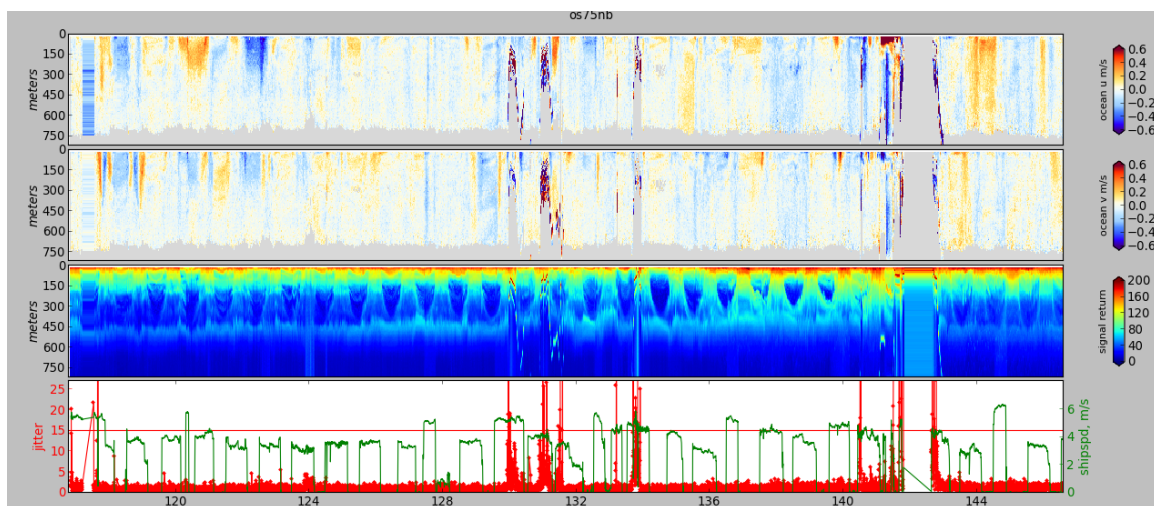


Fig.3b. Transecto de las componentes U y V y intensidad de la señal a lo largo del transecto. Los cambios de la intensidad de la señal corresponden a las paradas del barco en las estaciones.

El correcto funcionamiento del ADCP fue comprobado con la información independiente, la imagen de satélite (Fig.4) y el resultado de modelización de circulación superficial (Fig.5).

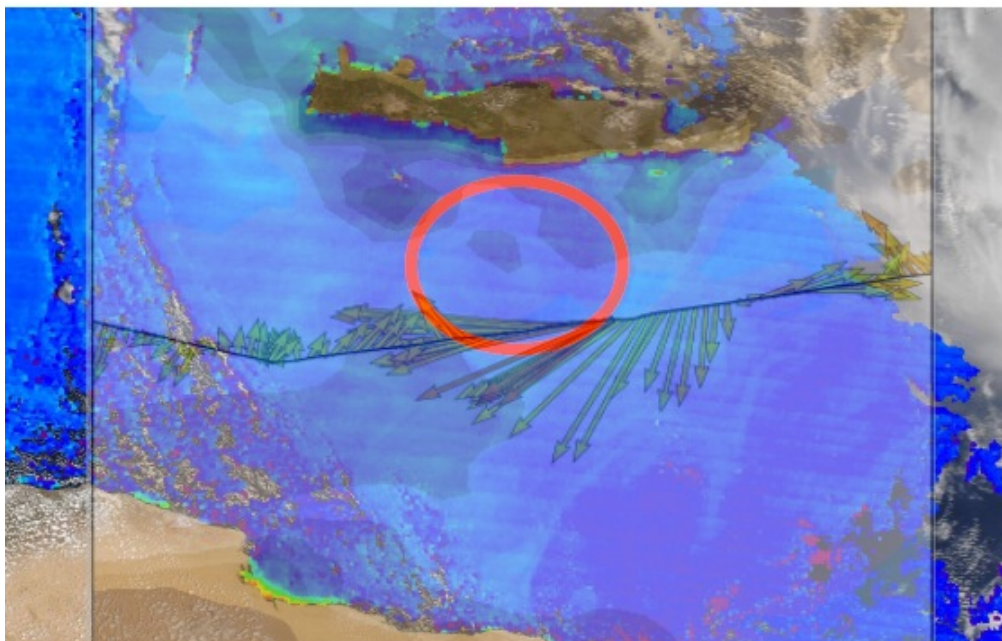


Fig.4. Remolino estacionario Ierapetra, situado al sur de Chipre con los vectores de corrientes superpuestos, obtenidos con ADCP del barco.

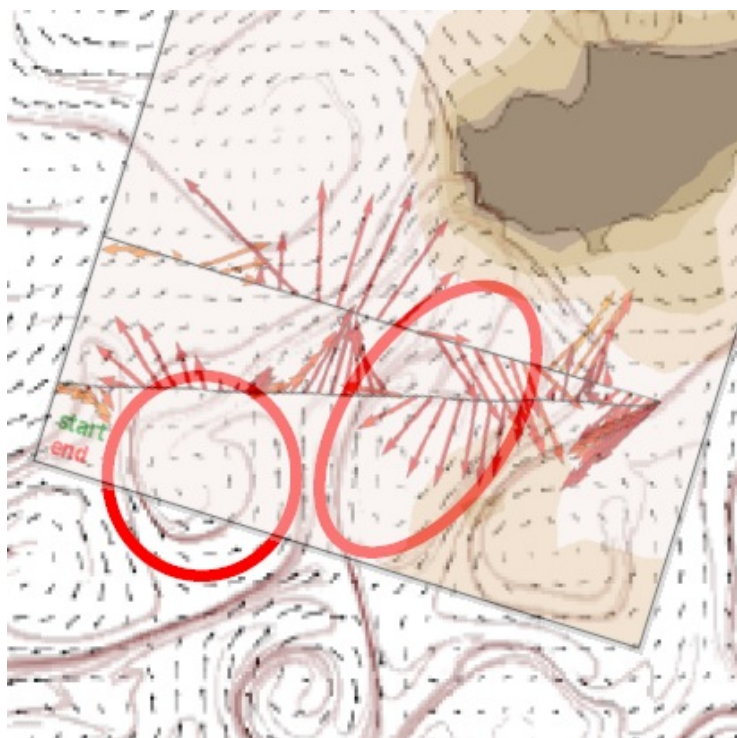


Fig.5. Circulación superficial al suroeste de Creta (modelo del Israel Oceanographic and Limnological Research Institute) con los vectores de corrientes superpuestos, obtenidos con ADCP del barco

2. LADCP

Durante los “CTD-casts” profundos hasta el fondo y someros hasta 300-600 m de profundidad, fueron obtenidos los perfiles verticales de velocidad de la corriente mediante LADCP (Lowered Acoustic Doppler Current Profiler) instalado en la “Roseta”. Los datos obtenidos fueron procesados con el paquete de programas, desarrollado en LDEO (Lamont-Doherty Earth Observatory) by M. Visbeck. El perfil (Fig.4) fue referenciado con el bottomtrack en el fondo y con los datos del SADC (ship-borne ADCP) en los primeros 800 metros de profundidad. El bloque del uso de datos de SADC fue activado mediante el uso de los ficheros correspondientes, generados durante el pre-procesado de datos con el programa CODAS.

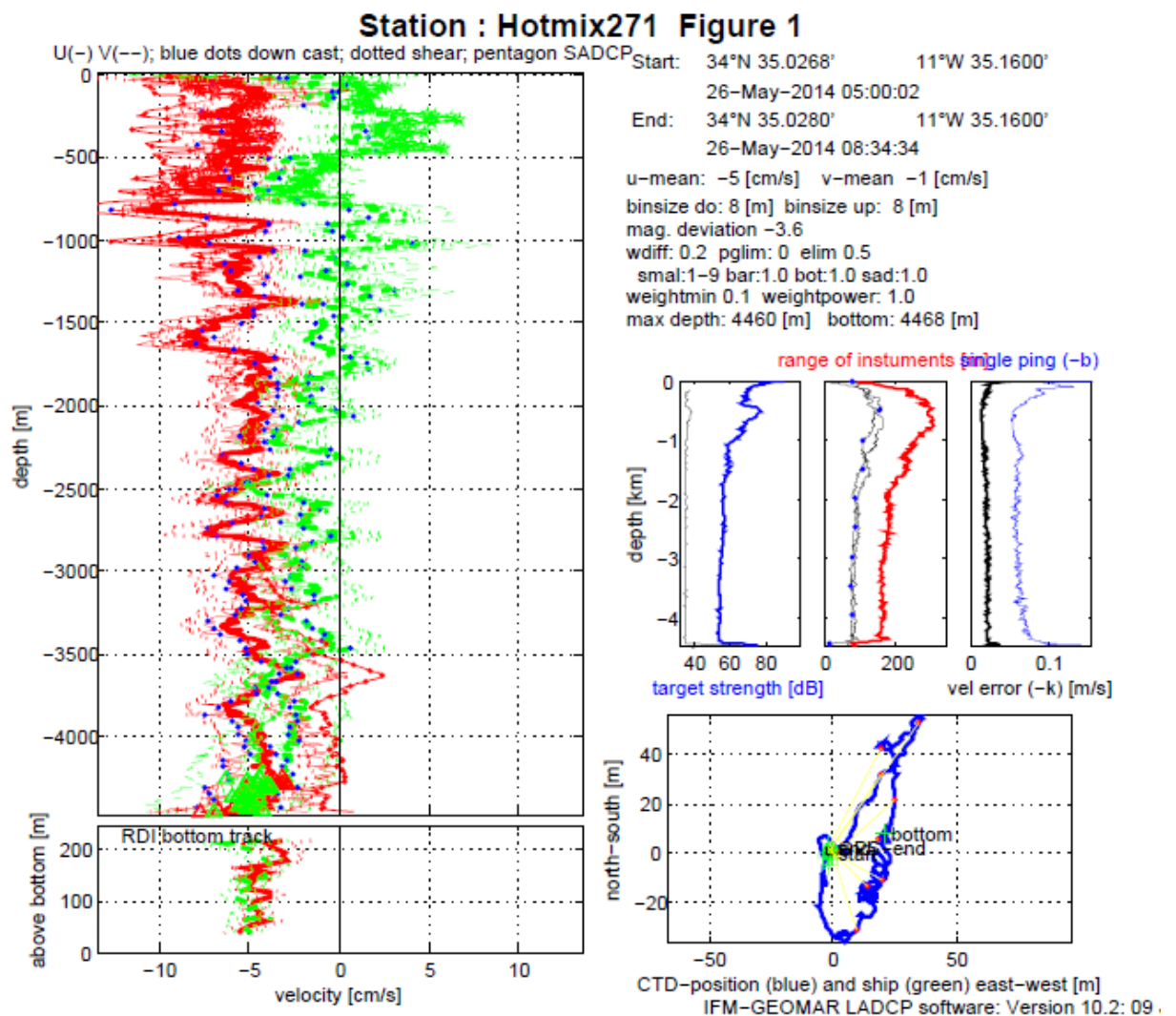


Fig.4. Ejemplo de los perfiles verticales (components U y V) de velocidad, obtenidos en la estación H27_1.

El procesamiento final será realizado después de la calibración de datos del SADC e intercalibración con los datos de LADCP.

Información sobre el contenido de carpetas con datos procesados

CTD. DATOS PROCESADOS

...\Datos\HOTMIX\CTD\PROCESADO\ASC\ASCII_DOWN

– ficheros *.asc – ASCII cast de bajada sin

cabecera

...\Datos\HOTMIX\CTD\PROCESADO\ASC\ASCII_DOWN&UP

– ficheros *.asc – ASCII cast de bajada y subida

sin cabecera

...\Datos\HOTMIX\CTD\PROCESADO\ASC\ASCII_UP

– ficheros *.asc – ASCII cast de subida sin

cabecera

...\Datos\HOTMIX\CTD\PROCESADO\BL

– ficheros *.asc – ASCII cast de subida sin

cabecera

...\Datos\HOTMIX\CTD\PROCESADO\BTL

– ASCII Información sobre el cierre de botellas
procesado

...\Datos\HOTMIX\CTD\PROCESADO\DOWN – ficheros *.cnv – ASCII cast de
bajada con

cabecera

...\Datos\HOTMIX\CTD\PROCESADO\DOWN&UP– ficheros *.cnv – ASCII cast de
bajada y

subida con cabecera

...\Datos\HOTMIX\CTD\PROCESADO\ROS– ficheros *.ros – ASCII cast sobre el
cierre de

botellas, necesario para generar el fichero *.btl

...\Datos\HOTMIX\CTD\PROCESADO\UP– ficheros *.cnv – ASCII cast de subida
con cabecera

LADCP. DATOS PROCESADOS

\\lasaca\Datos\HOTMIX\LADCP\PROCESADO\Numero de Estación

En la carpeta con el número de estación están puestos 4, en el caso del cast hasta el fondo, o 3, en caso del cast somero, ficheros con las siguientes extensiones:

*.lad – ASCII fichero con magnitudes de los componentes de velocidad U y V vs profundidad

*.bot – ASCII fichero con los últimos 200 metros sobre el fondo con magnitudes de los componentes de velocidad U y V vs profundidad (cast profundo hasta el fondo)

*.pdf – figura con los perfiles verticales de componentes de la velocidad U y V

*.mat – fichero en el formato MATLAB con toda la información procesada

Water sample salinity analysis

(M. Álvarez, M. Emilianov, H. San León Bartolomé,)

Along the HotMix cruise water column samples were taken preferentially below 500 dbar at every station (Figure 1) for salinity analysis in the salinometer provided by the RV Sarmiento de Gamboa.

Sampling and storage.

Samples for salinity were collected and stored in 250mL type II glass with disposable plastic insert and bakelite screw caps. Samples were collected at the very end of the sampling row, after all the other chemical and biological samples were drawn. The sampling bottle and screws were rinsed several times before the final sample was collected. A headspace is allowed inside the bottle to allow thermal expansion. Bottles were cleaned with fresh water (cape side up) and dried with a paper before stored upside down in a carrying crate and brought to the laboratory for temperature equilibration. Samples were stored at least 12 hours, maximum one week before analysis, in the laboratory where the salinity was to be measured, the “Pesca” lab on board Sarmiento de Gamboa.

Equipment and standarization.

The measurements were conducted with a Guildline Portasal salinometer Model 8410A provided by UTM on board RV Sarmiento de Gamboa. The equipment was placed in the “Pesca” lab with air-conditioning, although it was shared with several scientist and measurements. The bath temperature was set to 21.024°C and the room temperature was always kept between 18 and 20 °C. Whenever salinity was analyzed, the temperature room was stabilized and monitored 12 hours before the analysis, avoiding the shared use of the lab.

As the HotMix cruise covered Mediterranean Sea (salinity >38) and Atlantic Ocean (salinity <37) waters, the Autosal was standardized twice during the cruise, once at the beginning in Heraklion and another one after we crossed the Strait of Gibraltar into the Atlantic Ocean.

The first standarization was done with a 38H Series ($K_{15} = 1.07639$ at 21°C, PSS78 salinity = 38.023, batch 38H12), the second one with a P Series ($K_{15} = 0.99984$ at 21°C, PSS78 salinity = 34.994, batch P156). The standarization procedure is as follows: the Portasal was warmed up and primed using stabilized water from the ship continuous supply, after that the cell is flushed five times with a just opened standard, when the reading was constant the standarization procedure in the manual was started.

Measurement procedure

For each batch of measurements: the cell is flushed with stabilized water from the ship continuous supply, after this reading is stable, a new standard bottle is opened and measured, after that the series of samples is started; the batch finishes monitoring again any bias in the standard measurement. Usually three of four readings of the conductivity

ratio are taken for each sample. Each reading took about 2 minutes, the Portasal needed this time to stabilize.

The final conductivity ratio assigned to each sample is the mean of the readings corrected for any bias to the standard nominal value, also correcting any temporal bias between the beginning and the end of the batch analysis. In the seven batches of salinity analysis, the corrections to the conductivity ratio ranged from $-1.0 \cdot 10^{-5}$ to $7 \cdot 10^{-5}$.

The Portasal salinity was calculated with the “gsw_SP_salinometer” Matlab function in the Gibbs seawater (GSW) Oceanographic toolbox (2011), which calculates Practical Salinity using the algorithm of the Practical Salinity Scale of 1978 (PSS-78, (Unesco (1981, 1983))).

Results

A total of 128 salinity samples were checked in the Portasal, 23 of them were discarded. The difference between the measured salinity with the CTD and the Portasal vs. station and pressure are shown in Figure 1.

Taking just the data where the salinity difference is positive, the mean and standard deviation of the differences is: salinity CTD – Portasal = 0.0085 ± 0.116 .

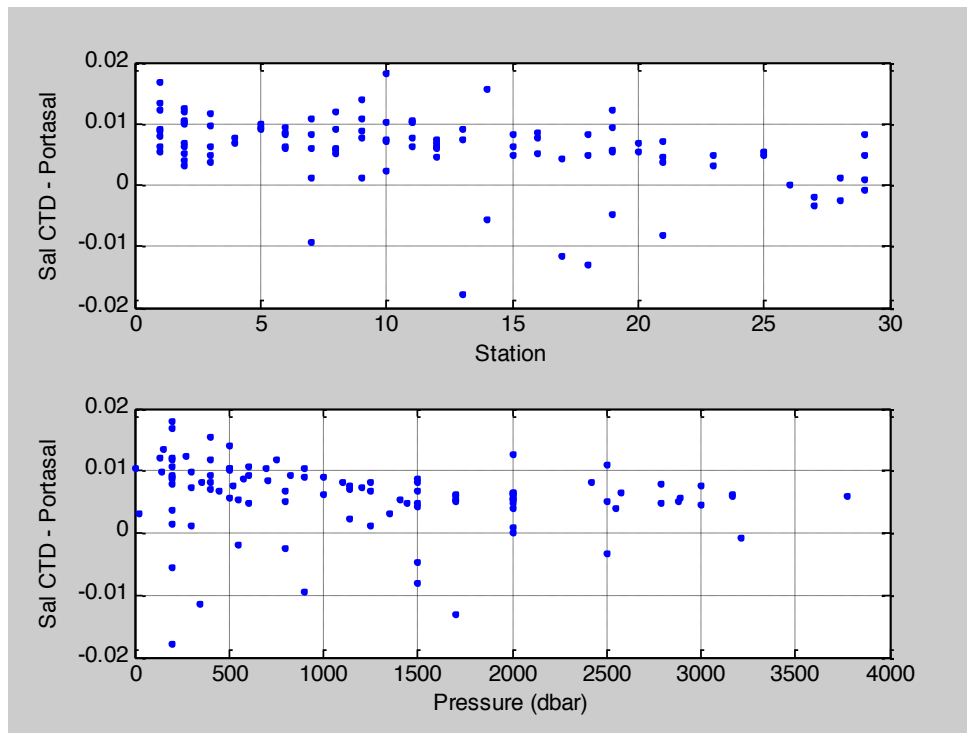


Figure 1. Distribution of the salinity differences between the CTD probe and the salinometer with station and pressure.

Work to be done

There seems to be a bias between the salinity measurements with the CTD probe and the salinometer. This mismatch is not acceptable, either the salinometer measurements are wrong or the CTD probe needs calibration (current calibration done in 2012). The next CTD calibration will be done in October 2014, after that the raw conductivity numbers in HotMix will be calculated and compared with the salinometer values. A decision will be taken then.

References

- Unesco (1981). The Practical Salinity Scale 1978 and the International Equation of State of Seawater 1980. Unesco technical papers in marine science 36, 25pp.
- Unesco (1983). Algorithms for computation of fundamental properties of seawater. Unesco technical papers in marine science 44, 53pp.

Dissolved Oxygen determination

(M. Alvarez, H. San León Bartolomé)

Dissolved oxygen in seawater was measured at every station and depth along the HotMix cruise and reported in $\mu\text{mol/kg}$. Oxygen was measured following the Winkler potentiometric method modified after Langdon (2010).

Sampling

Dissolved oxygen samples were either the first ones taken or immediately after the tracers ampoules. The oxygen samples were taken in pyrex “iodine titration” flasks with flared necks and ground glass stoppers, with a nominal volume of about 115 ml. The flasks were provided and calibrated at IEO – A Coruña.

Each Niskin bottle was sampled using a flexible silicone tubing placed at the bottom of the flasks, which was filled till overflowing. No bubbles were allowed. The temperature of seawater was measured with a digital thermometer while sampling.

The pickling reagents were immediately added afterwards, 1 ml each. The recommendations given in Langdon (2010) were carefully followed in this particular step.

After shaking the fixed samples were stored in the dark till the analysis, which was usually done within maximum 24 hours, minimum 2 hours.

Titration

The reagents used during the cruise are:

- Manganous chloride (3M)
- Sodium iodide (4M) / sodium hydroxide (8M)
- Sulfuric acid (5N)
- Thiosulfate (0.03M nominal)
- As standard solutions: potassium iodate (0.01N, provided by OSIL, UK) and potassium iodate (0.01N, home made)

Titrations were done within the sampling calibrated flasks using a 808 Titrand Metrohm potentiometric titrator with a platinum combined electrode. The Titrand was coupled with a exchangeable unit or burette of 5 ml. Nominal errors reported by the company are 0.1 mV and $\pm 15 \mu\text{L}$.

The pickling reagents were dispensed with a high precision bottle-top dispenser Varispenser 0.5-2.5 ml (Eppendorf). The iodate additions were dispensed with a high precision Multipette plus (Eppendorf).

Reagent blank and standardization of thiosulfate

The titration procedure for each batch of measurements is the following: i) start up the system to withdraw any bubbles in the dosing tubes titrating 2 to 3 faked samples; ii) reagent blank, 1ml iodate additions; ii) thiosulfate standardizations, 5 ml iodate additions; iv) real samples. All the reagents and the samples were stored in the same lab where the temperature varied $24\pm1^{\circ}\text{C}$. The details for the former steps are given in Langdon (2010).

Two independent reference materials for the iodate standard were used to follow the thiosulfate evolution:

- 1) Home made: a solution of around 0.01N prepared at IEO lab from ≈ 0.3567 gr of potassium iodate dissolved in 1L of distilled water. The temperature of the final solution was recorded and the molarity finally referred to 20°C .
- 2) Commercial potassium iodate solutions of 0.01N (20°C) provided by OSIL (UK).

The thiosulfate solution concentration and the reagent blank are assessed for each batch of measurements (Table 1 and Figure 1).

Table 1. Temporal evolution of the thiosulfate concentration and reagent blank along the cruise. CV stands for Coefficient of Variation and STD for standard deviation.

Batch	Date	Thiosulfate batch	Thiosulfate standardizations	Thiosulfate standardizations	Reagent Blank	Reagent Blank	Reagents	Standards
			Molarity 20°C	CV*100	ml	STD*100		
1	30-abr	1	0.02763	0.12	0.0010	0.08	1	IEO
1	30-abr	1	0.02756	0.10	0.0010	0.08	1	OSIL
2	2-may	1	0.02737	0.06	0.0012	0.02	1	IEO
2	2-may	1	0.02749	0.07	0.0012	0.02	1	OSIL
3	4-may	1	0.02745	0.09	0.0075	0.10	1	IEO
3	4-may	1	0.02754	0.14	0.0075	0.10	1	OSIL
4	7-may	1	0.02711	0.12	0.0017	0.12	1	IEO
4	7-may	1	0.02705	0.44	0.0017	0.12	1	OSIL
5	10-may	1	0.02714	0.09	0.0043	0.20	1	IEO
5	10-may	1	0.02734	0.10	0.0043	0.20	1	OSIL
6	13-may	2	0.02749	0.24	0.0017	0.20	1	OSIL
7	16-may	2	0.02728	0.11	0.0015	0.10	1	OSIL
8	19-may	2	0.02751	0.08	0.0045	0.22	1	OSIL
9	22-may	2	0.02739	0.18	0.0008	0.05	1	OSIL
10	26-may	3	0.02768	0.26	0.0041	0.08	1	OSIL
11	28-may	3	0.02761	0.09	0.0050	0.35	1	OSIL

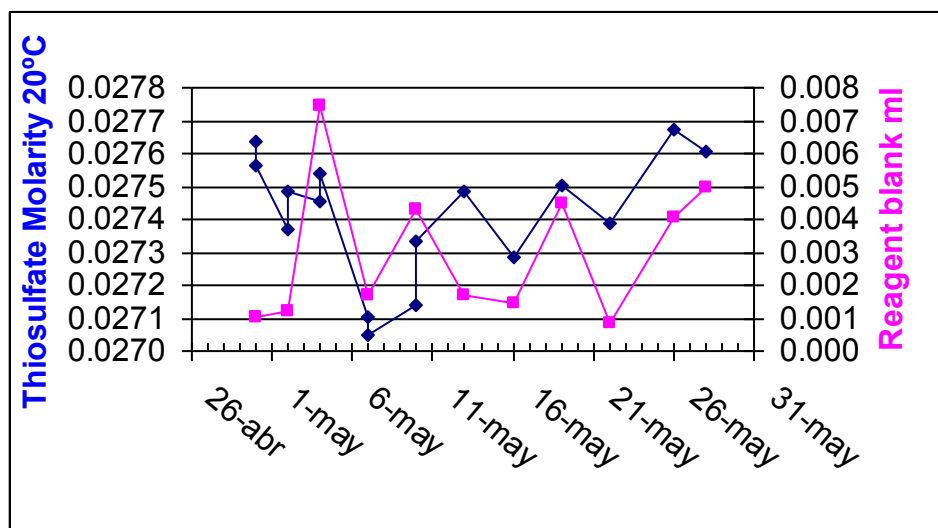


Figure 1. Temporal evolution of the Thiosulfate Molarity at 20°C and the Reagent Blank (ml) along the cruise.

Note that during the first 5 batches of measurements two different iodate standards were used to standardize the thiosulfate concentration yielding practically the same results and assuring the reproducibility of our results with regard to the preparation of the iodate standard and the titration procedure for the standardization.

Reproducibility

One reproducibility exercise was performed along the cruise. Several samples were taken from the same Niskin bottle and analysed afterwards. The results are shown in Table 2.

Table 2. Reproducibility exercise for dissolved oxygen samples withdrawn from the same Niskin bottle.

Station_Cast	Niskin	Pressure (dbar)	Salinity	O ₂ (μmol/kg)	STD	N
12_1	20	1201	38.762	183.6	0.26	5

These results allow us to tell that the precision for the dissolved oxygen measurements during the HotMix cruise was ± 0.3 μmol/kg.

Work to be done

A first quality control is to be done; the final database will contain quality flagged data. The winkler data collected will be used to calibrate the SBE-43 oxygen sensor attached to the CTD probe.

References

Langdon, C (2010). Determination of dissolved oxygen in seawater by winkler titration using the amperometric technique. IOCCP Report N°14, ICPO publication series N 134.

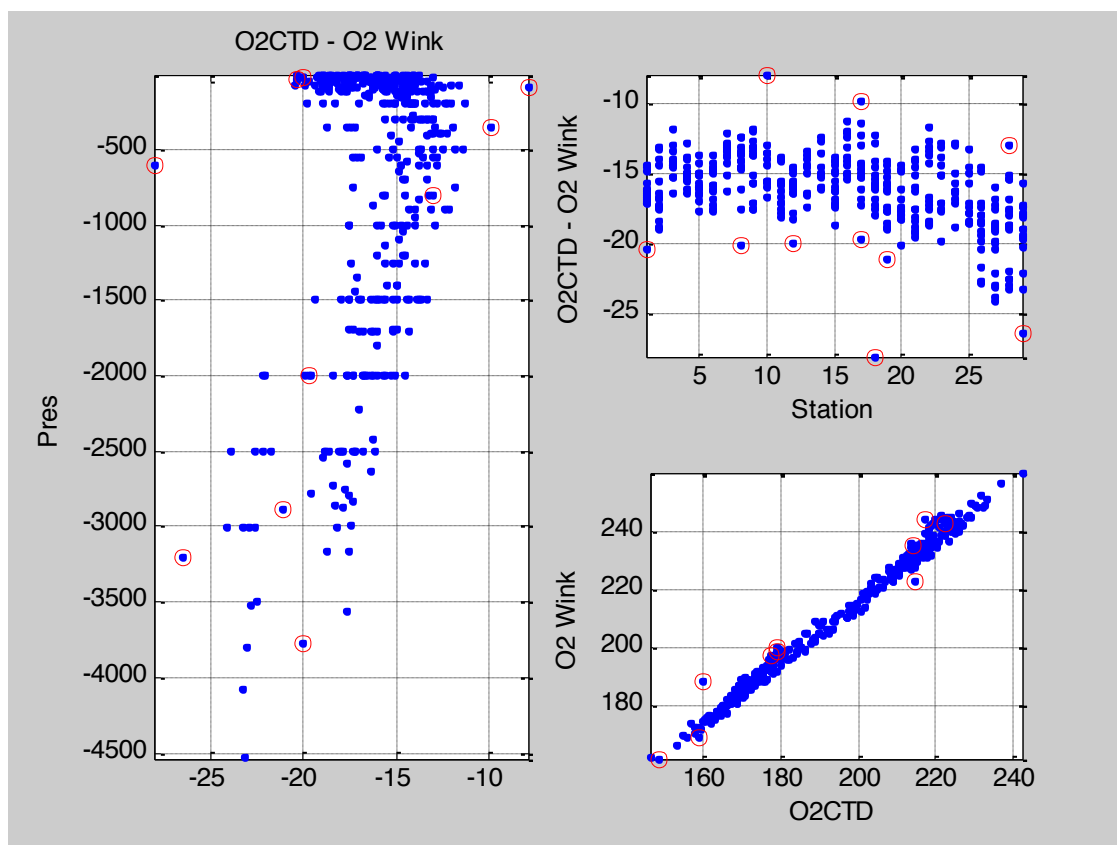
Quality control and O2CTD calibration

The oxygen data from the CTD sensor and the winkler analysis are plotted versus pressure and one-another for every station in order to find any suspicious data, that are flagged with a QC flag = 3, according to WOCE criteria.

After taking rid of this bad numbers, using a simple interpolation scheme we tried to get the best adjustment of the O2CTD data to the winkler analysis.

The figure below shows the distribution of the difference between O2CTD and O2Winkler (umol/kg) with pressure and station number, and also the direct relationship between both. Red circles correspond to bad winkler data.

The O2CTD – O2winkler difference depends on pressure and the station, is clear that after the Strait of Gibraltar (station 26 onwards) the O2CTD – O2Win relationship changed (see ther residuals). This is not in the winkler analysis as station 25, 26 and 27 were analyzed within the same batch of analysis.



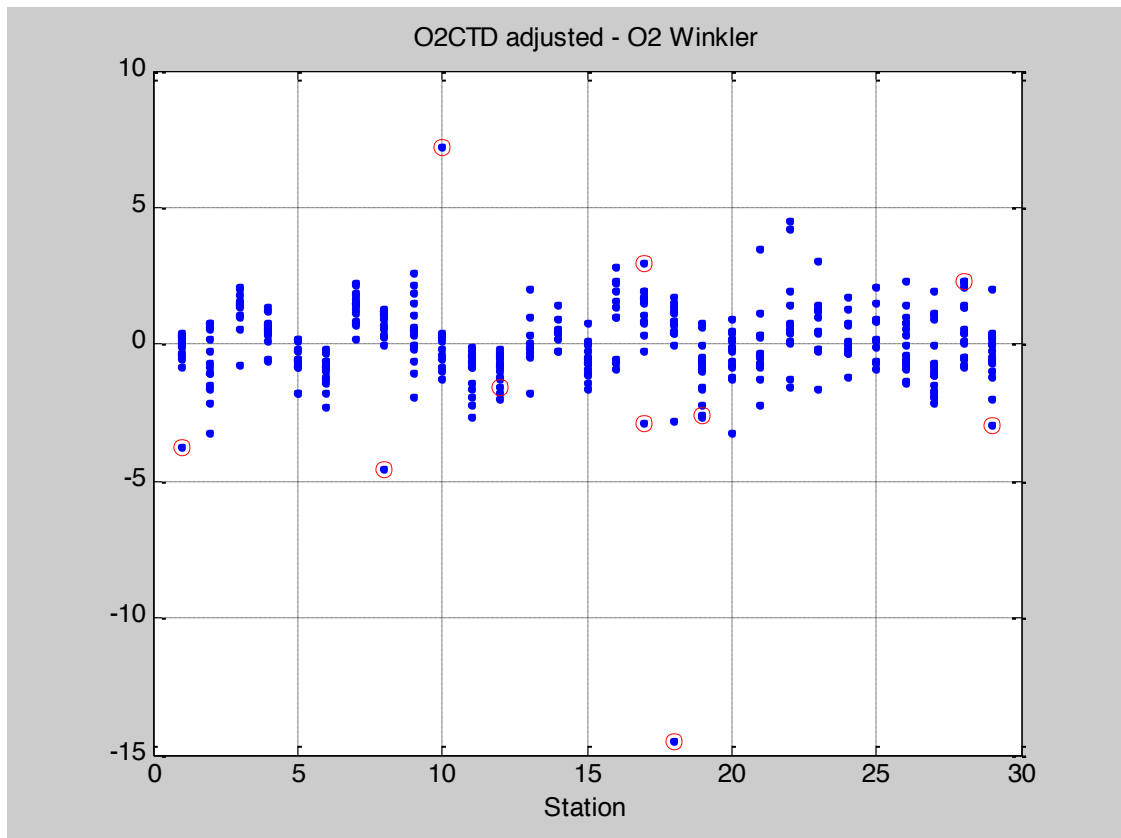
O₂ winkler data flagged wrong

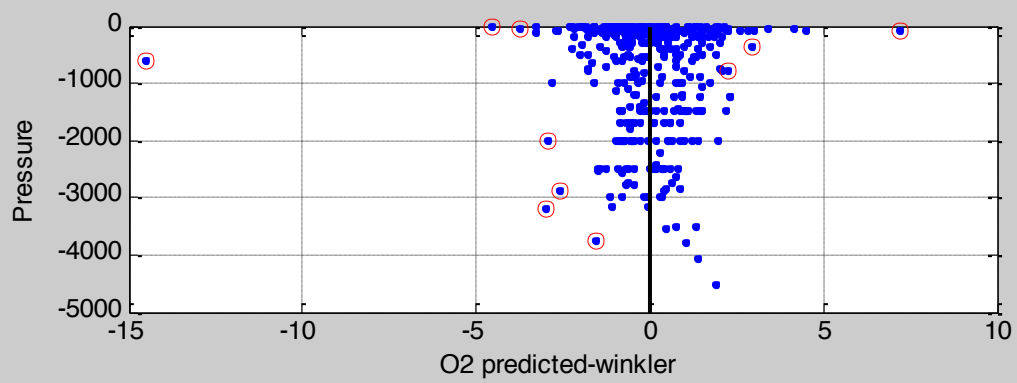
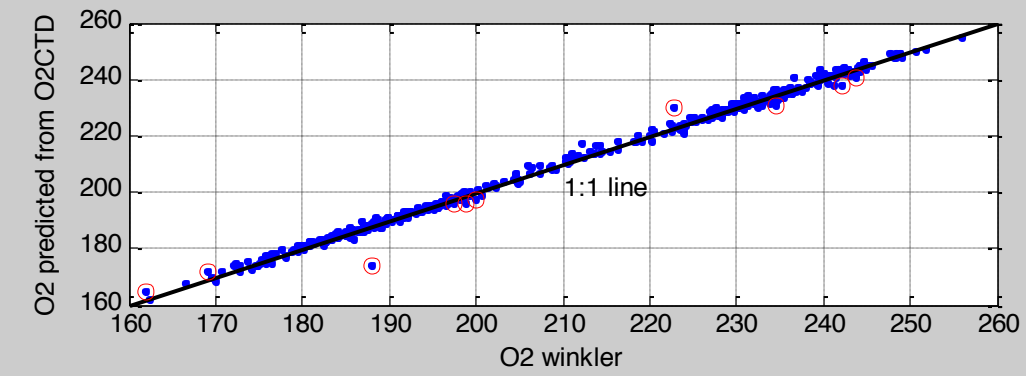
Station	Cast	Bottle	Pressure
1	2	14	35
8	2	18	25
10	2	5	93
12	1	4	3771
17	1	19	350
17	1	8	2001
18	3	3	602
19	1	4	2886
28	3	7	801
29	1	1	3209

The best adjustment of O2CTD to O2winkler is obtained with the function
[B,BINT,R,RINT,STATS] = REGRESS(O2W,[O2CTD,O2CTD.^2,(Pres-2000).^2,Pres-2000,Station,Station.^2,Station.^3,ones(1912,1)]);

Taking out the wrong winkler data, the residuals distribute as below, with mean and STD of 0.05 ± 1.2 umol/kg (N=386).

Corrected or calibrated O₂ from the CTD data is given in the excel file containing the set of bottle data for the HotMix cruise (HotMix_Bottles.xls).





Transient Tracers sampling

(M. Álvarez, T. Tanhua, H. San León Bartolomé,)

Along the HotMix cruise water column samples were taken at scattered depths and stations (Figure 1) for the analysis of the transient tracers, CFCs and SF₆. Collected samples will be finally analyzed in the tracer lab at GEOMAR (Kiel, Germany).

Samples were taken right after the Niskin bottle opening and directly in glass 300 mL ampoules. The Niskin bottles were not cleaned with isopropanol. Ampoules were filled to overflowing, but due to water scarcity they were not left to overflow twice the volume. Immediately after sampling the ampoules were sealed under a pure N₂ atmosphere. Each ampoule was properly identified with a code and the ampoule number was noted in the log sheet. Samples will be measured onshore with Gas Chromatography / Purge and Trap.

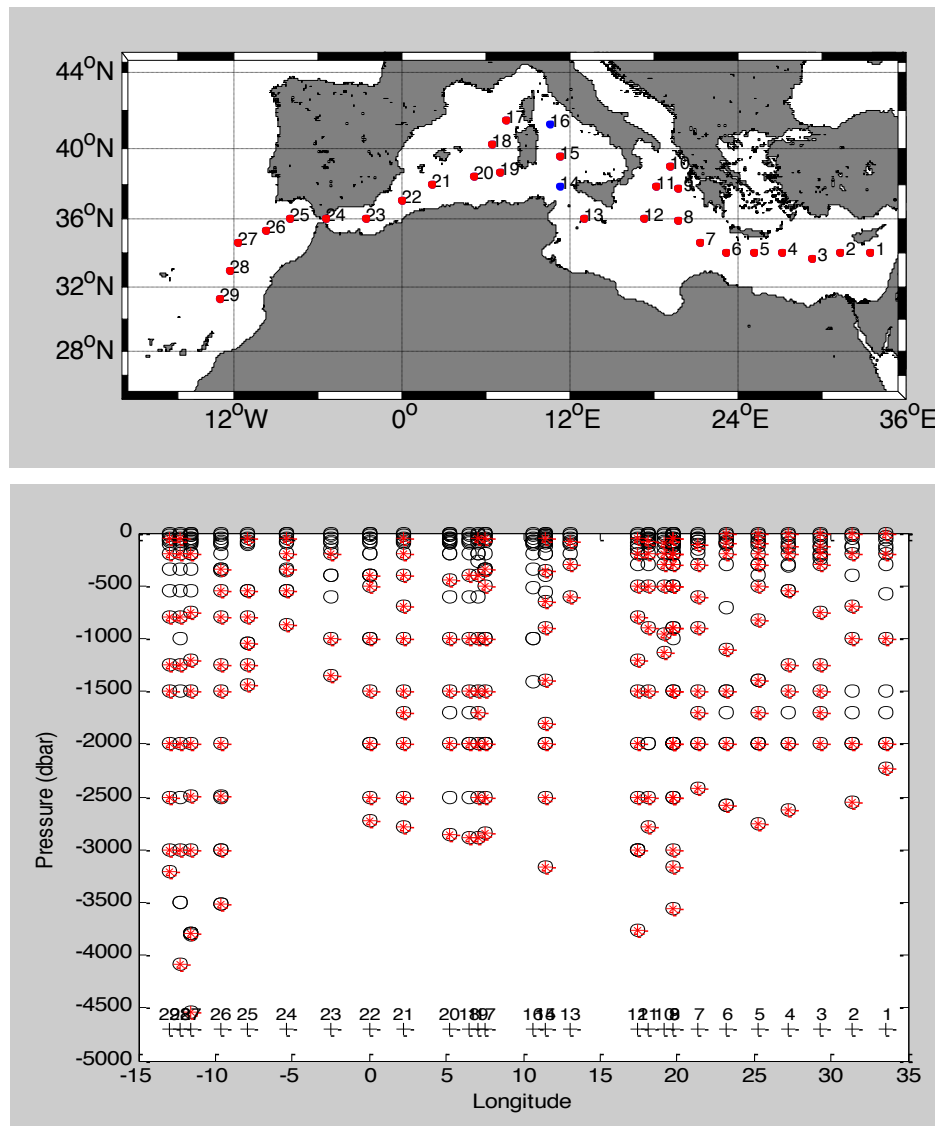


Figure 1. Longitudinal and vertical distribution of the tracer sampling.

The CO₂ system

(M. Álvarez, H. San León Bartolomé, T. Tanhua)

Along the HotMix cruise water column samples were taken and analyzed on board for pH, alkalinity and the concentration of carbonate ion (CO₃²⁻) on every station and depth. Scattered water column samples for Dissolved Inorganic Carbon (DIC) were taken and stored to be analyzed in the GEOMAR CO₂ lab (Kiel, Germany). Surface partial pressure CO₂ (pCO₂) data were automatically measured on board with the pCO₂ General Oceanics system facility on board the Sarmiento de Gamboa.

pH determination

Spectrophotometric pH in seawater was measured following Clayton and Byrne (1993) at every station and depth along the HotMix cruise and reported at 25°C and on the Total scale, hereinafter pH_{25T}.

Sampling

pH was sampled after Dissolved Inorganic Carbon (DIC), which was also immediately taken after dissolved oxygen and the tracers, when sampled. Samples were collected in cylindrical optical glass 10-cm pathlength cells, which were filled to overflowing and immediately stoppered. After sampling the cells are immediately stabilised at 25°C.

Analytical method.

Seawater pH was measured using a double-wavelength spectrophotometric procedure (Byrne, 1987). The indicator was a solution of m-cresol purple (Sigma Aldrich) prepared in seawater (2 mM). The indicator was kept in a blood bag out of contact with the air and light.

All the absorbance measurements were obtained in the thermostatted (25±0.2 °C) cell compartment of a SHIMADZU UV-2600 double beam spectrophotometer. The temperature was controlled with a POLYSCIENCE (12L) thermostatic bath.

After blanking with the sampled seawater without dye, 50 ml of the dye solution were added to each sample using an adjustable repeater pipette (Eppendorf Multipette plus). The absorbance was measured at three different fixed wavelengths (434, 487.6, 578 and 730 nm), pH, on the total hydrogen ion concentration scale, is calculated using the following formula (Clayton and Byrne, 1993):

$$\text{pH}_T = 1245.69/T + 3.8275 + (2.11 \cdot 10^{-3})(35-S) + \log((R-0.0069)/(2.222-R \cdot 0.133))$$

where R is the ratio of the absorbances (A) of the acidic and basic forms of the indicator corrected for baseline absorbance at 730 nm ($R = (578A-730A) / (434A-730A)$), T is temperature in Kelvin scale and S is salinity. Measurements at the isosbestic point 487.6 nm are used to control the amount of dye added.

As the injection of the indicator into the seawater perturbs the sample pH slightly, the absorbance ratios measured in the seawater samples (R_m) should be corrected to the R values that would have been observed in an unperturbed analysis (R_{real}). In order to do this, we obtain the correction in the absorbance ratio of every sample as a function of the absorbance ratio measured (R_m). This linear function was calculated from second additions of the indicator over samples with a wide range of pH:

$$R_{real} = R_m - (-0.0048 \pm 0.0013 \cdot R_m + 0.0033 \pm 0.0022); \quad r^2 = 0.10, \quad n=135$$

This function also corrects for deviations in the linear relationship between absorbance and the indicator concentration; i.e., deviations from the Beer Law in the spectrophotometer. Figure 1 shows the relationship between the first addition ratio (R_1) and the DR ($R_2 - R_1$) for the set of double additions over a range of R , equivalent to pH.

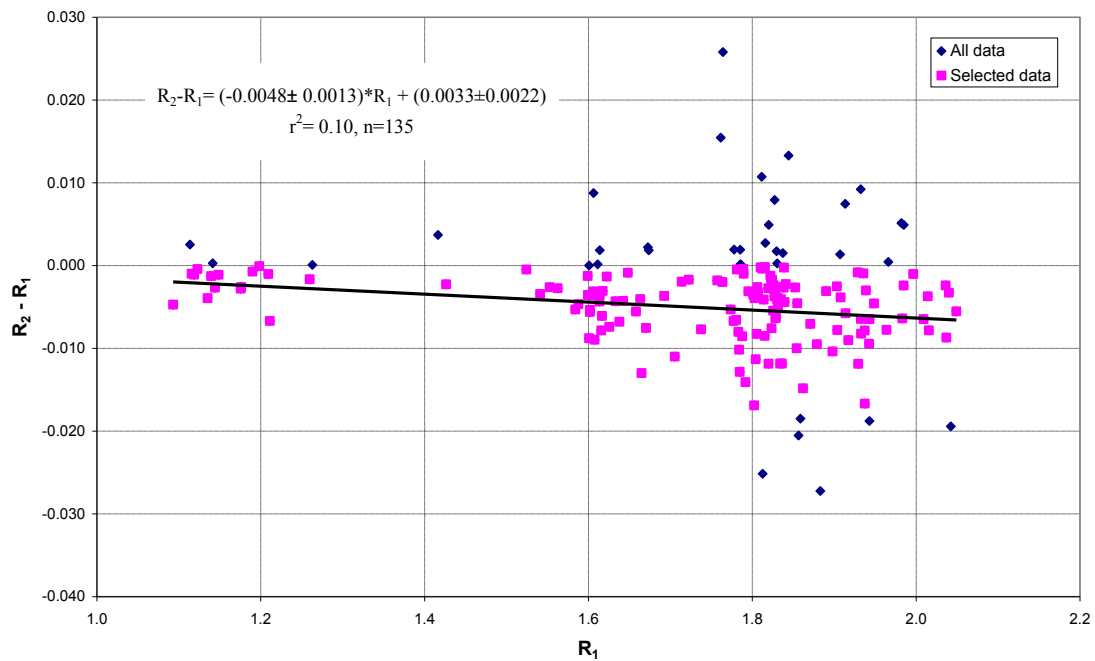


Figure 1. Perturbation of sample pH induced by addition of indicator, expressed as DR ($=R_2 - R_1$) as a function of R_1 . R_1 is the first addition and R_2 the double addition. R is the ratio between absorbances $((578A - 730A)/(434A - 730A))$.

All the pH measurements are referred to 25°C and corrected for the addition of the indicator using the former formula. The magnitude of that correction over our range of pH is small ranging from 0.0008 to 0.0016 pH units, which are added to the uncorrected pH values.

Accuracy.

In order to check the precision of the pH measurements, samples of CO₂ reference material (CRM, batch 117, distributed by A.G. Dickson from the Scripps Institution of Oceanography, SIO) were analyzed during the cruise. Ten to fifteen samples from a CRM bottle (batch 117, certified chemical characteristics for salinity, 33.503; silicate,

1.7 $\mu\text{mol kg}^{-1}$; nitrate, 1.14 $\mu\text{mol kg}^{-1}$; nitrite, 0.00 $\mu\text{mol kg}^{-1}$; phosphate, 0.37 $\mu\text{mol kg}^{-1}$; total alkalinity, $2239.18 \pm 0.64 \mu\text{mol kg}^{-1}$; and total inorganic carbon, $2009.99 \pm 0.52 \mu\text{mol kg}^{-1}$) were drawn carefully to avoid bubbles and analysed for pH using the spectrophotometric method. The corresponding theoretical pH_{25T} value for this batch using the dissociation constants from Mehrbach *et al.* (1973) refitted by Dickson & Millero (1987) is 7.9424.

The series of CRMs measurements analysed for pH are shown in Table 1. Our pH measurements are lower than the theoretical value. This issue will be commented when the complete set of CO₂ measurements are measured and reported, and the corresponding internal consistency analysis is done.

Table 1. Mean and standard deviation (STD) values for the CRM batch 117 determinations on pH. N stands for the number of measurements and pH diff is the difference with the theoretical value using the Mehrbach *et al.* (1973) refitted by Dickson and Millero (1987) CO₂ constants.

pH _{25T}	STD	N	pH diff
7.9325	0.0016	11	-0.0099

Reproducibility

Regarding the reproducibility of our measurements, two times along the cruise when enough water and time was available, we analysed several samples collected from the same Niskin bottle (Table 2). The mean of the STD is ± 0.0014 which could be considered as the reproducibility of pH measurements during the cruise.

Table 2. Characteristics of the replicate samples taken along the cruise, the mean and standard deviation (STD) and number of cells collected from each bottle for the pH analysis.

Station_Cast	Niskin	Pressure (dbar)	Salinity	pH _{25T}	STD	N
24_1	8	551	38.510	7.8710	0.0007	8
20_1	24	1000	38.497	7.9036	0.0020	5

Alkalinity determination

Total Alkalinity (TA) along the HotMix cruise was analysed following a double end point potentiometric technique by Pérez y Fraga (1987) further improved in Pérez *et al.* (2002). This technique is faster than the whole curve titration but comparable (Mintrop *et al.*, 2000).

Sampling.

Seawater samples for TA were collected after pH samples, in 600 ml borosilicate bottles and stored in the laboratory until analysis, usually no later than 2 days. Samples were filled to overflowing and immediately stopped.

Analytical method

TA was measured using an automatic potentiometric titrator "Titrand 909 Metrohm", with a Metrohm Aquatrode Plus 6.302.6150 combination glass electrode and a Pt-1000 probe to check the temperature. The system is coupled with a 5 mL exchangeable unit. Potentiometric titrations were carried out with hydrochloric acid ($[HCl] = 0.1N$) to a final pH of 4.40 (Pérez and Fraga, 1987). The electrodes were standardised using an ftatalate buffer of pH 4.42 made in CO_2 free seawater (Pérez *et al.*, 2002). Concentrations are given in $mmol\ kg^{-1}$. Table 3 shows the value of the asymmetrical pH (pHas), which is the value of the electrode pH after its calibration. The 0.1N hydrochloric acid was prepared mixing 0.5 mol (18.231 g) of commercially HCl supplied by Riedel-deHaën® (Fixanal 38285) with distilled water into a graduated 5-L beaker at controlled temperature conditions. The HCl normality is exactly refereed to 20°C. The variation of salinity after the titration is lower than 0.1 units, which is taken into account in the final TA calculation.

Accuracy

CRM analyses were performed in order to control the accuracy of our TA measurements (Figure 2). Accordingly, the final pH of every batch of analyses was corrected to obtain the closest mean TA on the CRM analyses to the certified value. Table 3 shows the pH (DpH) correction applied to each batch and the mean value of the CRM determinations after applying the former correction.

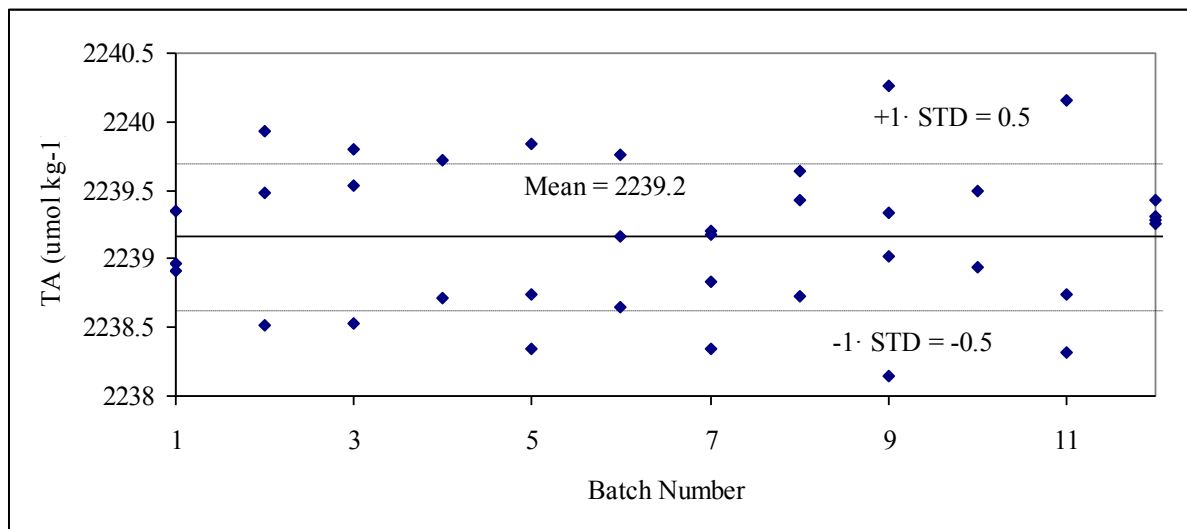


Figure 2. Alkalinity ($\mu mol\ kg^{-1}$) measurements on the CRM batch 108 during the cruise against station number. The final mean and standard deviation (STD) for the 65 determinations was $2239.2 \pm 0.5\ \mu mol\ kg^{-1}$.

Usually, each sample is analysed twice for alkalinity. Table 3 shows the average standard deviation of the replicates analysed during each batch of analysis. This difference was about $1.0 \mu\text{mol kg}^{-1}$. In order to check the precision of the TA measurements, surface seawater was used as a “quasi-steady” seawater substandard (SB). It consists in surface seawater taken from the non-toxic supply and stored in the dark into a large container (35 L) during 2 days before use. This substandard seawater was analyzed at the beginning and at the end of each batch of analyses to control the drift in the analyses for each batch. The estimated drift for each day was very low.

Table 3. Alkalinity analysis supplementary information for each batch of analysis: N_{HCl} is the normality referred to 20°C of the hydrochloric solution used; ΔpH is the pH correction applied to refer the TA determinations on the CRM to the corresponding nominal value (batch 117 with a certified TA of $2239.18 \pm 0.64 \mu\text{mol kg}^{-1}$). The mean value of the TA measurements on the CRM samples is also shown (Fitted TA \pm standard deviation (number of analysis)). The average of the difference (Av. Dif.) in the duplicate’s analyses is shown.

Batch	April-May 2014	Stations	N_{HCl}	DpH	Fitted TA	Av. Dif.
1	30	1-2	0.099959	0.027	$2239.08 \pm 0.24(3)$	0.6
2	02	3-4	0.099959	0.020	$2239.31 \pm 0.72(3)$	1.0
3	04	5-6	0.099959	0.020	$2239.29 \pm 0.67(3)$	0.7
4	06	7-8	0.099959	0.017	$2239.21 \pm 0.71(2)$	0.8
5	08	9-10	0.099959	0.025	$2238.97 \pm 0.77(3)$	1.0
6	11	11-12-13	0.099959	0.026	$2239.19 \pm 0.56(3)$	0.7
7	14	14-15-16	0.099959	0.026	$2238.89 \pm 0.4(4)$	0.7
8	17	17-18-19	0.099959	0.040	$2239.27 \pm 0.48(3)$	0.6
9	20	20-21-22	0.099959	0.028	$2239.19 \pm 0.87(4)$	0.6
10	23	23-24	0.100156	0.026	$2239.21 \pm 0.39(2)$	0.7
11	25	25-26	0.100156	0.032	$2239.07 \pm 0.44(3)$	0.5
12	28	27-28-29	0.100156	0.030	$2239.32 \pm 0.07(4)$	0.7

Reproducibility

We analysed several samples collected from the same Niskin bottle (Table 4), the obtained STD value of $\pm 0.8 \text{ mmol kg}^{-1}$ could be considered as the reproducibility of TA measurements during the cruise.

Table 4. Characteristics of the replicate samples taken along the cruise, the mean and standard deviation (STD) and number of analysis performed from each bottle for the TA analysis.

Station_Cast	Niskin	Pressure (dbar)	Salinity	TA mmol kg ⁻¹	STD	N
19_1	13	2001	38.479	2583.4	0.8	11

Dissolved Inorganic Carbon sampling and storage

Samples for DIC were taken at selected depths during the cruise and properly stored to be finally measured at the GEOMAR lab using a coulometric technique, SOMMA unit.

Samples were taken in either 250 or 500 ml borosilicate bottles, which are filled after the oxygen samples and immediately poisoned with saturated HgCl₂ (100 or 200 µL, respectively). A small headspace is allowed in the DIC bottle for the water to expand. The stoppers were greased with Apiezon L and sealed with a rubber band and collar.

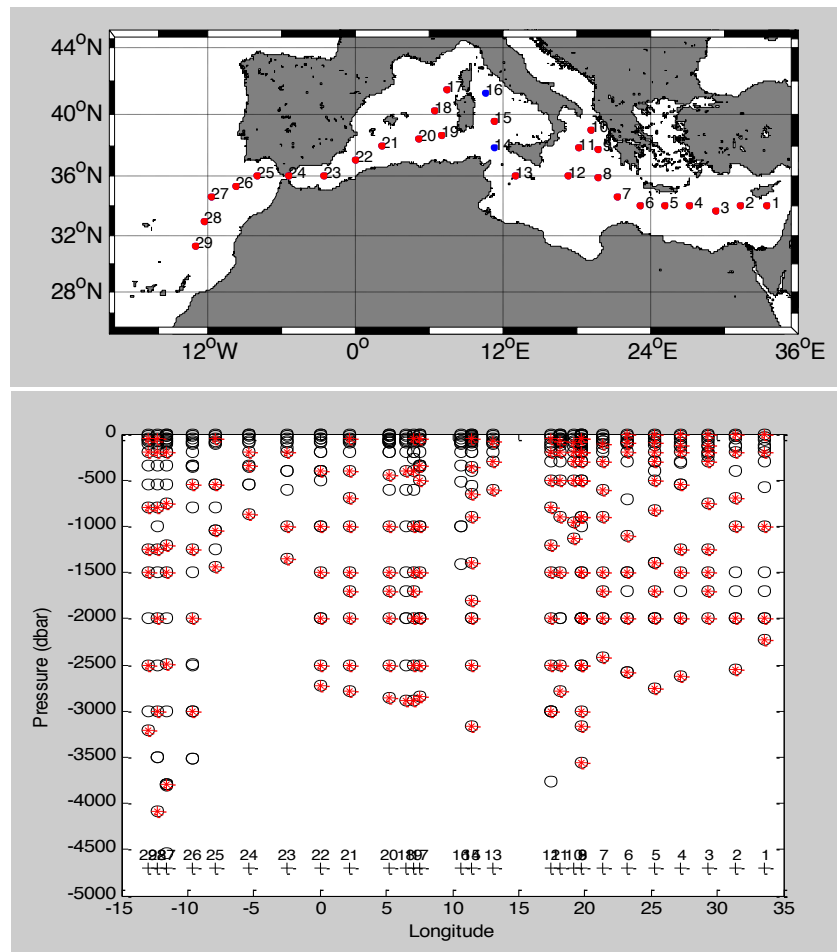


Figure 3. Longitudinal and vertical distribution of the DIC sampling.

Carbonate ion concentration

The carbonate ion concentration (CO_3^{2-}) was determined spectrophotometrically following the recent method first proposed by Yao and Byrne (2008) and further reformulated by Easley et al. (2013).

Sampling.

CO_3^{2-} was sampled after pH. Samples were collected in cylindrical optical quartz 10-cm pathlength cuvettes, which were filled to overflowing and immediately stoppered. After sampling the cells are immediately stabilised at 25°C.

Analytical method

The concentration of CO_3^{2-} in seawater was measured in every sample using the method proposed by Yao and Byrne (2008). A solution of 1.1 mM of the titrant PbCl_2 (Sigma Aldrich, 99.999% purity dissolved in Milli-Q water) is added to the seawater sample, the complex PbCO_3 formed afterwards is detected spectrophotometrically in the UV spectra. All the absorbance measurements were obtained in the thermostatted ($25 \pm 0.2^\circ\text{C}$) cell compartment of a SHIMADZU UV-2600 double beam spectrophotometer. The temperature was controlled with a POLYSCIENCE (12L) thermostatic bath.

After blanking with the sampled seawater without the PbCl_2 solution, 225 ml of the dye solution were added to each sample using an adjustable repeater pipette (Eppendorf Multipette plus). The absorbance was measured at three different three wavelengths (234, 250 and 350 nm), 234 nm is the isosbestic point of PbCO_3 , 250 nm is the mean value of the wavelengths presenting high absorbance variation and 350 nm is a non-absorbing wavelength to monitor PbCO_3 .

Total carbonate ion concentration is given by:

$$-\log([\text{CO}_3^{2-}]_T) = \log_{\text{CO}_3}\beta_1 + \log((R - e_1)/(e_2 - R \cdot e_3))$$

where R is the ratio of the absorbances (A) ($R = (250A - 350A) / (234A - 350A)$), $\text{CO}_3\beta_1$ is the PbCO_3 formation constant, and e_i are the molar absorptivity ratios dependent on salinity. The fitting parameters are taken from Easley et al. (2013). Small deviations from fitting temperature 25°C (maximum 1.5°C) are corrected using the equation from Fajar (2013) where T is temperature in °C:

$$[\text{CO}_3^{2-}]_T / [\text{CO}_3^{2-}]_{25} = -(0.033 \pm 0.001) \cdot (T - 25) + (1.007 \pm 0.002)$$

As determined in Easley et al. (2013) no perturbations are taken into account due to the complexation of free CO_3^{2-} by Pb(II) from the PbCl_2 titrant.

Reproducibility

Regarding the reproducibility of our measurements, once along the cruise when enough water and time was available, we analysed several samples collected from the same Niskin bottle (Table 3). The STD is ± 2.2 mmol/kg (1.13% precision) which could be considered as the reproducibility of CO_3^{2-} measurements during the cruise.

Table 3. Characteristics of the replicate samples taken, the mean and standard deviation (STD) and number of cells collected from each bottle for the CO_3^{2-} analysis, concentrations in mmol/kg .

Station_Cast	Niskin	Pressure (dbar)	Salinity	CO_3^{2-}	STD	N
20_1	24	1000	38.497	194.2	2.2	6

Work to be done

A quality control is to be done; the final database will contain quality flagged data for each CO_2 variable.

The availability of five CO_2 variables, water column pH, CO_3^{2-} , alkalinity and DIC and surface pCO_2 will allow us to perform an internal consistency analysis. This is the first time such an amount of CO_2 variables were measured in the Mediterranean Sea and adjacent Atlantic Ocean.

References

- Byrne R. H. (1987). Standardization of standard buffers by visible spectrometry. *Analytical Chemistry*, 59, 1479-1481.
- Byrne, R. H. and Yao, W. (2008). Procedures for measurement of carbonate ion concentrations in seawater by direct spectrophotometric observations of Pb(II) complexation, *Marine Chemistry*, 112(1-2), 128–135, doi:10.1016/j.marchem.2008.07.009.
- Clayton and Byrne (1993). Spectrophotometric seawater pH measurements: total hydrogen ion concentration scale concentration scale calibration of m-cresol purple and at-sea results. *Deep-sea Research I*, Vol. 40, 10, 2115-2129.
- Dickson, A.G., Millero, F.J. (1987). A comparison of the equilibrium constants for the dissociation of carbonic acid in seawater media. *Deep-Sea Research* 34, 1733–1743.
- Easley, R.A., Patsavas, M.C., Byrne, R. H., Liu, X., Feely, R.A., Mathis, J.T. (2013). Spectrophotometric measurement of calcium carbonate saturation states in seawater. *Environ. Sci. Technol.*, 47 (3), 1468–1477.
- Merzbach, C., Culberson, C.H., Hawley, J.E., Pytkowicz, R.M. (1973). Measurement of the apparent dissociation constants of carbonic acid in seawater at atmospheric pressure. *Limnology and Oceanography*, 18, 897–907.
- Mintrop, L., F. Fernández-Pérez, M. González Dávila, A. Körtzinger and J.M. Santana Casiano (2000). Alkalinity determination by potentiometry- intercalibration using three different methods. *Ciencias Marinas*, 26, 23-37.
- Pérez, F.F. and F. Fraga (1987). A precise and rapid analytical procedure for alkalinity determination. *Marine Chemistry*, 21, 169-182
- Pérez, F.F., A.F. Ríos, T. Rellán and M. Álvarez (2000). Improvements in a fast potentiometric seawater alkalinity determination. *Ciencias Marinas*, 26, 463-478.

Biogases sampling

(M. Álvarez, H. Bange, H. San León Bartolomé)

Along the HotMix cruise water column samples were taken at scattered depths and stations (Figure 1) for the analysis of the biologically produced gases, CH₄ and N₂O. Collected samples will be finally analyzed in the biogas lab at GEOMAR (Kiel, Germany).

Samples were taken after alkalinity. Triplicate 20 mL vials were used to sample for N₂O / CH₄. The vials were rinsed and carefully filled till overflowing. Then they are encapsulated with a crimp and butyl stopper using a crimping tool. Afterwards 50 mL of saturated HgCl₂ were introduced in the sealed sample using a syringe. Vials are finally stored at room temperature in the dark.

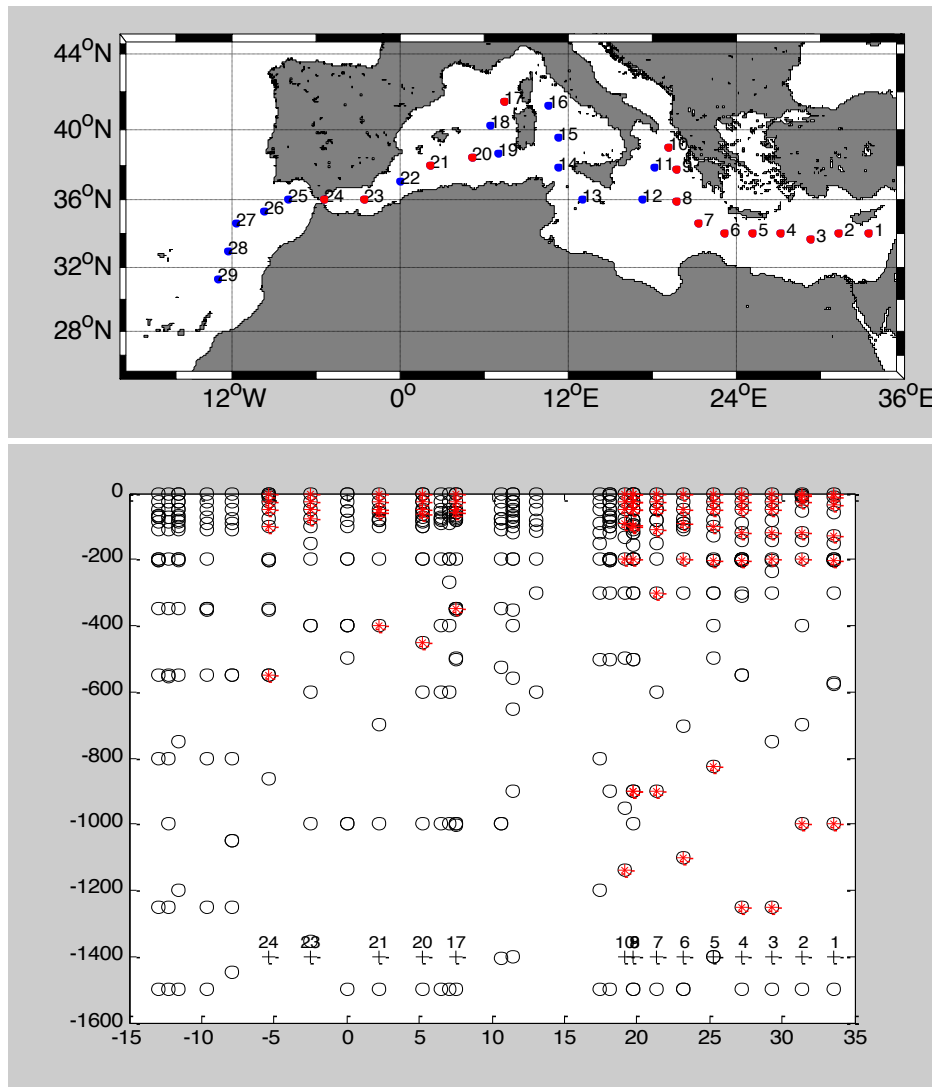


Figure 1. Longitudinal and vertical distribution of the biogases sampling.

Sales nutrientes

Vanesa Vieitez dos Santos, Laboratorio de Geoquímica Orgánica, CSIC Instituto de Investigaciones Mariñas.

Se recogieron muestras de agua para el análisis de la concentración de sales nutrientes (nitrato+nitrito, fosfato y silicato) en todas las estaciones y profundidades muestreadas durante la campaña (en total, 400 muestras).

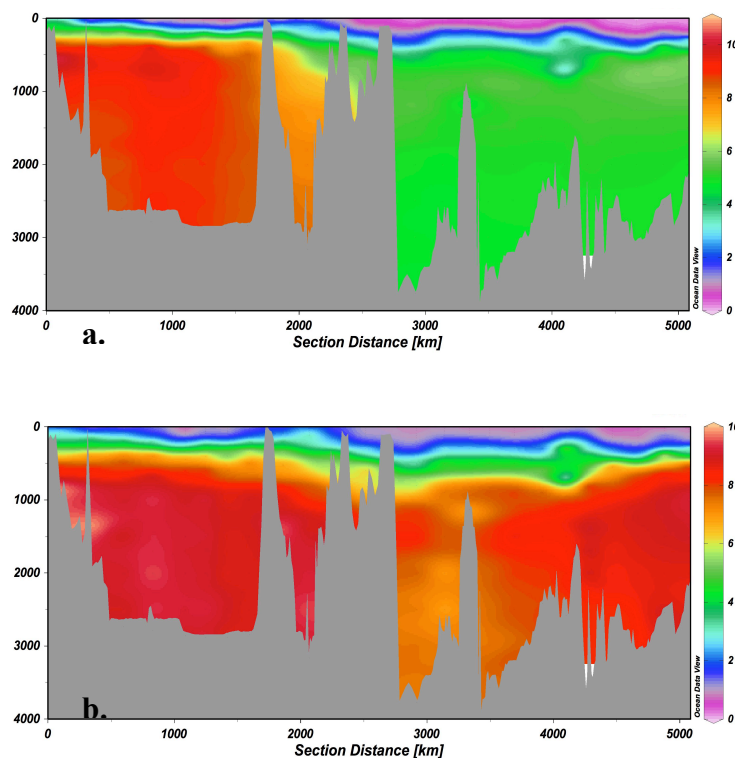


Figura 1. Distribución de las concentraciones de nitrato+nitrito (a) y silicato (b) a lo largo del Mar Mediterráneo (estaciones 1–24). Valores en $\mu\text{mol L}^{-1}$.

El agua para realizar estos análisis se tomó directamente de las botellas Niskin en tubos de polietileno de 25 mL previamente lavados con soluciones diluidas de lejía (0.5%), HCl (1%) y agua milli-Q y se conservaron en nevera a 4°C hasta el momento de sus análisis. El lapso entre la toma y análisis de las muestras no excedió las 3 horas.

Las concentraciones de nitrato+nitrito, fosfato y silicato se determinaron simultáneamente por métodos automáticos de análisis en flujo continuo segmentado con detección colorimétrica con un analizador Skalar SAN++. Para el calibrado de los sistemas se utilizaron patrones primarios mixtos de KNO_3 , KH_2PO_4 y NaSiF_6 preparados en agua Milli-Q de concentración diferente para el Mar Mediterráneo (estaciones 1–24; 1,305 mM de KNO_3 , 0,0642 mM de KH_2PO_4 y 0,991 mM de NaSiF_6) y el Océano Atlántico (estaciones 25–29; 3,026 mM de KNO_3 , 0,202 mM de KH_2PO_4 y

5,082 mM de NaSiF_6). Los autoanalizadores se calibraron con patrones de 5 concentraciones diferentes preparados diluyendo distintos volúmenes del patrón primario en agua de mar baja en sales nutrientes (agua superficial del Mediterráneo oriental) filtrada por 0.2 μm . Como blanco se utilizó una disolución de NaCl (calcinado a 600°C durante 1 hora) en agua milli-Q.

En la **Figura 1** se muestran las distribuciones de la concentración de nitrato+nitrito y de silicato a lo largo del Mar Mediterráneo (estaciones 1 a 24), en las que se puede apreciar la notable diferencia entre las cuencas este y oeste.

Caracterización elemental y óptica de la materia orgánica disuelta

Teresa S. Catalá, Departamento de Ecología / Instituto del Agua, Universidad de Granada

X. Antón A. Salgado, Laboratorio de Geoquímica Orgánica, CSIC Instituto de Investigaciones Mariñas.

Se recogieron muestras de agua para el análisis de la concentración de carbono orgánico y nitrógeno total disuelto, la obtención de espectros de absorción y de matrices de excitación-emisión de fluorescencia de la materia orgánica disuelta en todas las estaciones y profundidades muestreadas durante la campaña (en total, 400 muestras). El agua para realizar estos análisis se recogió directamente de las botellas Niskin en frascos de vidrio de 250 mL con tapón de vidrio esmerilado previamente lavados con disoluciones diluidas de lejía (0.5%), HCl (1%) y agua milli-Q. Además, en estaciones y profundidades seleccionadas, se tomaron muestras para la determinación de carbono y nitrógeno total y fluorescencia de la materia orgánica disuelta volátil (ver **Tabla 1**).

Carbono orgánico y nitrógeno total

De cada frasco de vidrio de 250 mL se recogieron inmediatamente después del muestreo dos alícuotas en ampollas de vidrio de 10 mL previamente calcinadas durante 24h a 450°C y acidificadas con H₃PO₄ a pH < 2. Estas ampollas se sellaron a la llama y se conservarán en nevera a 4°C hasta el momento de su análisis en el Laboratorio de Geoquímica Orgánica del Instituto de Investigaciones Marinas (CSIC) por métodos de oxidación catalítica a alta temperatura con un analizador Shimadzu TOC-V equipado con una unidad de determinación de nitrógeno total TNM-1.

Materia orgánica disuelta cromófora (CDOM) y fluorescente (FDOM)

Una vez tomadas las alícuotas para el análisis de carbono orgánico y nitrógeno total disuelto, los frascos de vidrio de 250 mL se dejaron reposar en oscuridad hasta alcanzar la temperatura ambiente antes de proceder a la obtención de los espectros de absorción y las matrices de excitación-emisión de fluorescencia de la fracción cromófora de la materia orgánica disuelta.

Las muestras correspondientes a las zonas meso- (200–000 m) y batipelágica (1000 m – fondo) se midieron directamente. Por el contrario, las muestras correspondientes a la zona epipelágica se filtraron previamente a través de un filtro GF/F (calcinado a 450°C durante 4 horas) en un sistema de filtración de vidrio bajo presión positiva de N₂ de alta pureza. El agua filtrada se recogió en frascos de vidrio ámbar de 25 mL con tapón de teflón lavados en (1%) y enjuagados con agua milli-Q abundante.

Espectros de absorción de CDOM

Se registraron espectros de absorción de CDOM con dos instrumentos: (i) un espectrofotómetro de doble haz Perkin Elmer Lambda 850 equipado con cubetas prismáticas de cuarzo de 10 cm de camino óptico; y (2) un fino capilar de 100 cm de longitud y 250 μL de volumen LPC100CM conectado por fibra óptica a una fuente de luz DH2000BAC y a un detector USB2000+UV-VIS ES, todo ello de la casa comercial Ocean Optics. El conjunto se controla a través de un PC en el que se ha instalado el software Spectra-suite. Finalmente, las muestras se dispensan al capilar a un flujo aproximado de 1 mL min^{-1} con una bomba peristáltica. La **Figura 2** ilustra la disposición de los distintos módulos que conforman el sistema para la determinación de CDOM con el capilar LPC100CM.

El motivo de realizar medidas con ambos instrumentos ha sido los extremadamente bajos niveles de CDOM del Mar Mediterráneo, que producen una gran incertidumbre en la determinación de coeficientes de absorción a longitudes de onda superiores a 300 nm cuando se usa un camino óptico de 10 cm.

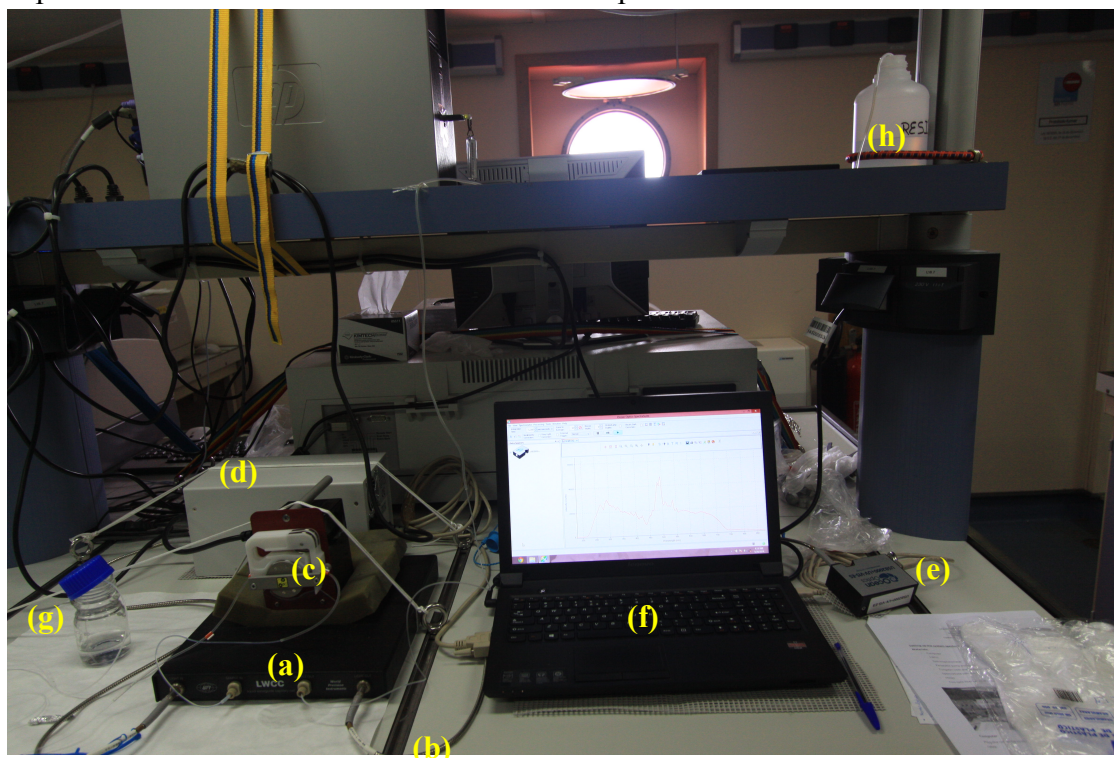


Figura 2. Montaje para la determinación de espectros del coeficiente de absorción de la materia orgánica disuelta cromófora con capilar de 100 cm de camino óptico. (a) Celda capilar, (b) Fibra óptica, (c) Bomba peristáltica, (d) Fuente de luz, (e) Espectrofotómetro, (f) Ordenador portátil, (g) Muestra, (h) Residuos. Foto: M. Nieto-Cid.

Con ambos instrumentos se registraron los espectros de absorción de todas las muestras entre 250 y 700 nm de longitud de onda. En el caso del Perkin Elmer Lambda 850 se ha escogido un tiempo de integración de 0,08 segundos, un ancho de banda de 1 nm, se ha realizado un espectro de cada muestra y se han registrado valores cada nm. En

el caso del LPC100CM de Ocean Optics se ha escogido un tiempo de integración de 1200 microsegundos, se ha tomado la media de 10 espectros para cada muestra y se han registrado valores cada 0,36 nm. En ambos instrumentos se ha usado agua milli-Q recién producida como referencia.

Los espectros del coeficiente de absorción de las muestras, $a_{\text{CDOM}}(\lambda)$ (en m^{-1}), se corrigieron substrayéndoles los correspondientes espectros de agua milli-Q determinados al principio, medio y fin de cada serie de muestras y aplicando la ecuación:

$$a_{\text{CDOM}}(\lambda) = 2.303 \cdot \frac{\text{Abs}(\lambda) - \text{Abs}(600 - 700)}{l}$$

Donde $\text{Abs}(\lambda)$ es la absorbancia a λ nm; $\text{Abs}(600-700)$ es la absorbancia media entre 600 y 700 nm con el objeto de corregir la posible dispersión causada fundamentalmente por partículas en suspensión y micro-burbujas; y l es el camino óptico, 0,1 m en el caso del Perkin Elmer Lambda 850 y 1 m en el caso del LPC100CM de Ocean Optics.

En la **Figura 3** se muestra un ejemplo de los espectros de absorción característicos de las zonas bati-, meso- y epipelágica de la cuenca oriental del Mar Mediterráneo, donde se registraron los coeficientes de absorción mas bajos.

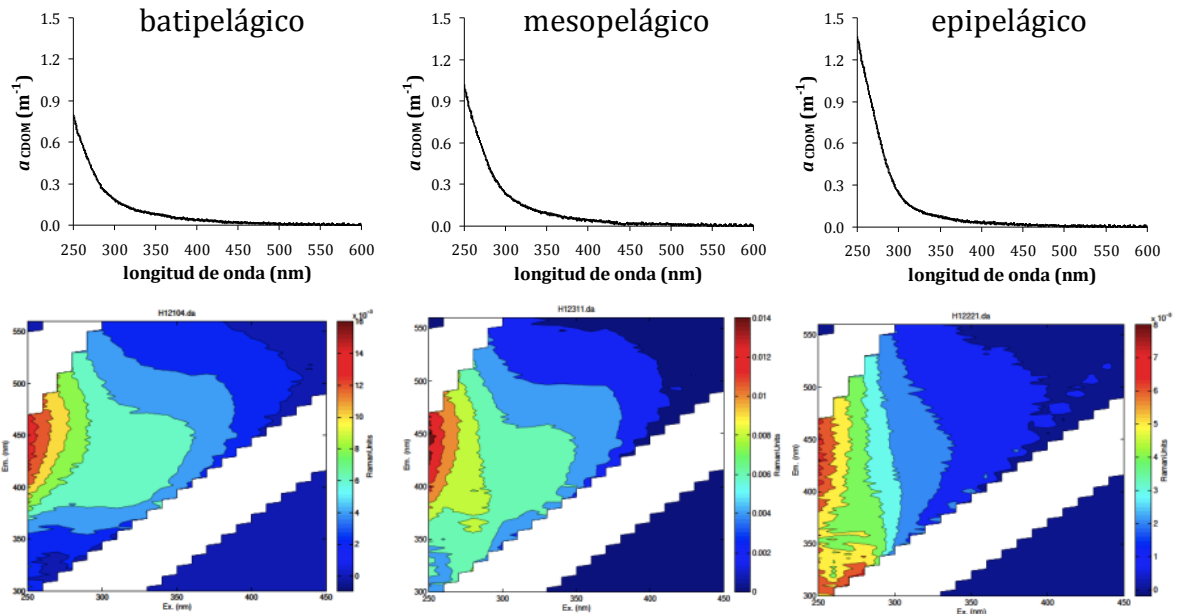


Figura 3. Espectros del coeficiente de absorción (panel superior) y matrices de excitación-emisión de la fluorescencia (panel inferior) de la materia orgánica disuelta cromófora correspondientes a los niveles bati-, meso- y epipelágico del Mediterráneo Occidental (estación 12). Coeficientes de absorción en m^{-1} y fluorescencia en unidades raman.

La **Figura 4** presenta la distribución de los coeficientes de absorción a 254 nm, indicador de la concentración de carbono orgánico disuelto, y 325 nm, indicador de la abundancia de sustancias de naturaleza húmica a lo largo del Mar Mediterráneo.

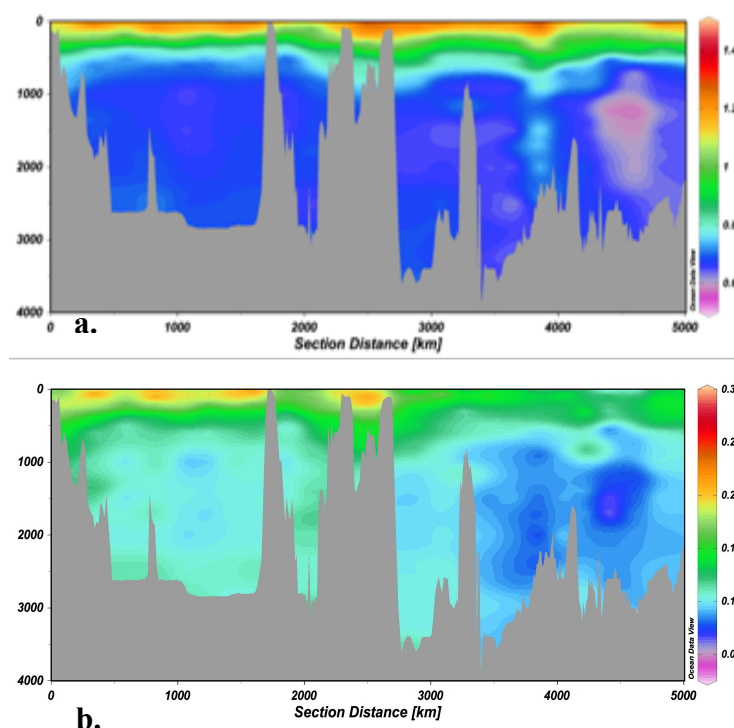


Figura 4. Distribución de los coeficientes de absorción de la materia orgánica disuelta cromófora a 254 nm (a) y 325 nm (b) a lo largo del Mar Mediterráneo (estaciones 1–24). Valores en m^{-1} .

Matrices de excitación-emisión de FDOM

Con un espectrofluorímetro Fluoromax–4 de Horiba, se obtuvieron matrices cuadradas de excitación-emisión de la fluorescencia de CDOM realizando espectros concatenados de excitación entre 240 nm y 450 nm cada 10 nm y registrando la emisión correspondiente entre 300 y 560 nm utilizando anchos de ranura de 5 nm tanto para la excitación como para la emisión. A las muestras analizadas cada día se les restó la matriz de excitación-emisión del agua milli-Q recién producida obtenida en ese mismo día de análisis con el fin de corregir la banda de dispersión Raman producida por las moléculas del agua y normalizar las matrices en unidades Raman. Además, se eliminaron las bandas correspondientes a la dispersión Rayleigh de primer y segundo orden.

La consistencia del instrumento a lo largo de la campaña se comprobó utilizando una cubeta de agua milli-Q sellada (dispensada por Perkin Elmer) para comprobar la consistencia en la zona Raman, y bloques de terfenilo y terbutadieno inyectados en metacrilato (dispensados por Strana) para comprobar la consistencia en zona en la que

emiten fluorescencia los aminoácidos aromáticos y las sustancias húmicas, respectivamente.

En la **Figura 3** se muestran a modo de ejemplo las matrices de excitación-emisión de fluorescencia corregidas y normalizadas para las mismas muestras de las zonas bati-, meso- y epipelágica de la cuenca oriental del Mar Mediterráneo de las que se ha presentado el espectro del coeficiente de absorción.

Finalmente, en la **Figura 5** se presenta la distribución a lo largo del Mar Mediterráneo de la fluorescencia a longitudes de onda Ex/Em: 280 nm/320 nm (característica de los aminoácidos aromáticos) y 250 nm /450 nm (característica de las sustancias húmicas de origen marino).

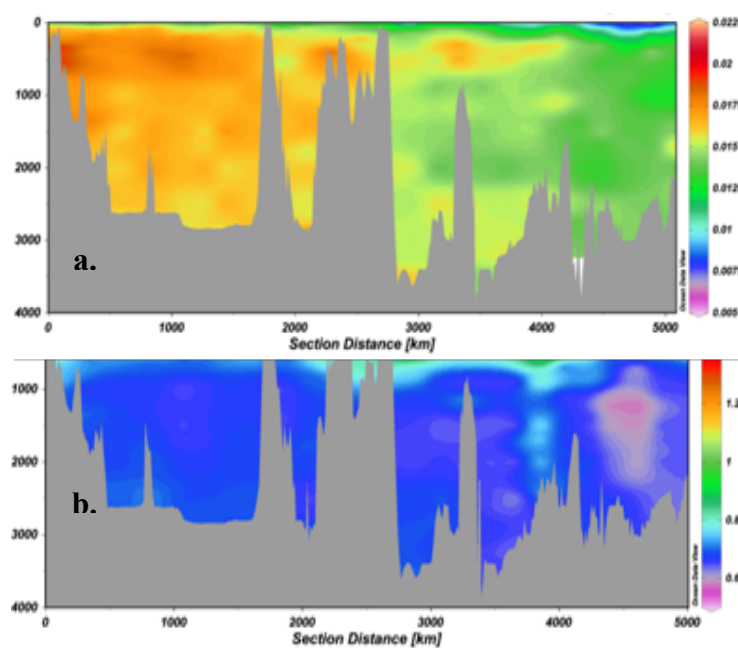


Figura 5. Distribución de las intensidades de fluorescencia características de las sustancias húmicas (panel superior) y los aminoácidos aromáticos (panel inferior) a lo largo del Mar Mediterráneo (estaciones 1–24). Valores de fluorescencia en unidades raman.

Carbono orgánico disuelto volátil (VDOC)

Para cuantificar el carbono orgánico volátil (VDOC), se purgó 1 L de agua (3 réplicas por muestra) con una corriente de N₂ puro (500–600 ml min⁻¹) durante 10 minutos en 50 mL de agua milli-Q. La **Figura 6** muestra el montaje utilizado. Las muestras se han recogido en las estaciones y profundidades mostradas en la **Tabla 1**.



Figura 6. Montaje para la obtención del carbono orgánico disuelto volátil. Foto: M. Nieto Cid

Tabla 1. Estaciones en las que se han recogido muestras para fraccionamiento, extracción en fase sólida con PPLs, compuestos volátiles y ultrafiltración de MOD.

Estación	Prof	Tipo	Parámetro			
			FRAC	PPLs	VDOC	UF
STN01	2000	EMDW	X	X	X	
	1000		X	X	X	
	575	min O2	X	X	X	
	200	LIW	X	X	X	
	130	DCM	X	X		
STN02	200	LIW				X
STN04	2000	EMDW	X	X		
	1250		X	X	X	
	550	min O2	X	X	X	
	200	LIW	X	X	X	
	118	DCM	X	X		
STN07	2000	EMDW	X	X		
	900	min O2	X	X	X	
	200	LIW	X	X	X	
	110	DCM	X	X	X	
STN09	2000	EMDW				X
STN10	950	min O2	X	X	X	
	200	LIW	X	X	X	
	92	DCM	X	X	X	
STN13	300	LIW	X	X		

STN15	2000	WMDW	X	X		
	650	min O2	X	X	X	
	350	LIW	X	X	X	
	75	DCM	X	X	X	
STN17	2000	WMDW				X
STN18	2000	WMDW	X	X		
	1000	min O2	X	X	X	
	400	LIW	X	X	X	
	60	DCM	X	X	X	
STN21	2000	WMDW	X	X		
	1000	min O2	X	X	X	
	400	LIW	X	X	X	
	60	DCM	X	X	X	
STN22	400	LIW				X
STN25	1050	MW	X	X	X	X
	800	min O2	X	X	X	
	75	DCM	X	X	X	
STN27	1200	MW			X	
	550	min sal	X	X	X	
	85	DCM	X	X	X	

Tras la purga se midió la fluorescencia de la materia orgánica disuelta a bordo con el espectrofluorímetro Fluoromax–4 de Horiba y se conservaron 20 mL de muestra en viales crimp con tapas de teflón en frío y en oscuridad para posteriormente medir la cantidad de carbono orgánico total (TOC) y nitrógeno total (TN) por oxidación catalítica a alta temperatura con un analizador Shimadzu TOC-V en el laboratorio del CSIC Instituto de Investigaciones Mariñas. La **Figura 7** muestra un ejemplo de las matrices de excitación emisión de fluorescencia obtenidas, en la que se aprecia una señal intensa a Ex/Em 270 nm / 320 nm.

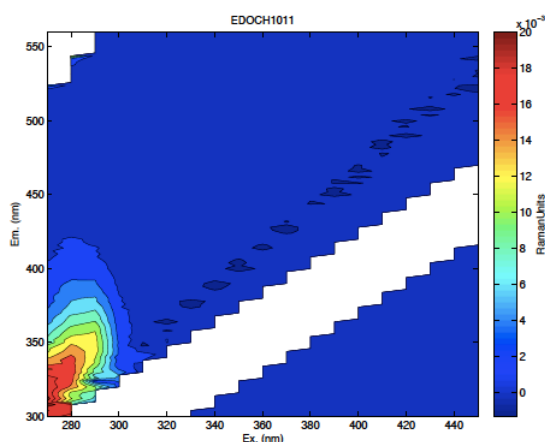


Figura 7. Ejemplo de una matriz de excitación/emisión de una muestra expurgada de la estación 11 para extraer el carbono orgánico volátil. El pico observado (270/320 nm) es característico de los aminoácidos aromáticos.

Caracterización molecular de la materia orgánica disuelta

Alba M. Martínez Pérez, Laboratorio de Geoquímica Orgánica, CSIC Instituto de Investigaciones Mariñas.

Mar Nieto Cid, Laboratorio de Geoquímica Orgánica, CSIC Instituto de Investigaciones Mariñas.

Fraccionamiento de la MOD

Se recogieron muestras para el análisis del fraccionamiento de la materia orgánica disuelta, empleando una célula de ultrafiltración (Millipore, modelo 2000), en las estaciones y profundidades mostradas en la **Tabla 1**. Las muestras se filtraron previamente con un filtro Whatman GF/F. Para realizar el fraccionamiento se colocó una membrana de ultrafiltración de 1000 Da (MILLIPORE, PLAC 150mm) en la célula y se aplicó una presión de 55 psi utilizando una bala de aire de nitrógeno comprimido. Se recogieron muestras para el análisis de DOC y para las medidas directas en el barco de FDOM y CDOM, tanto las fracciones resultantes (bajo y alto peso molecular) como la muestra original (control, filtrada por GF/F). La efectividad de la célula de ultrafiltración se comprobó con una disolución de vitamina B12 (Sigma, 50 mg/L), resultando ser de un 80%.

En la **Figura 8** se muestra la evolución de la fluorescencia húmica de las muestras control, lmw (bajo peso molecular) y hmw (alto peso molecular) para la masa de agua LIW a lo largo del transecto.

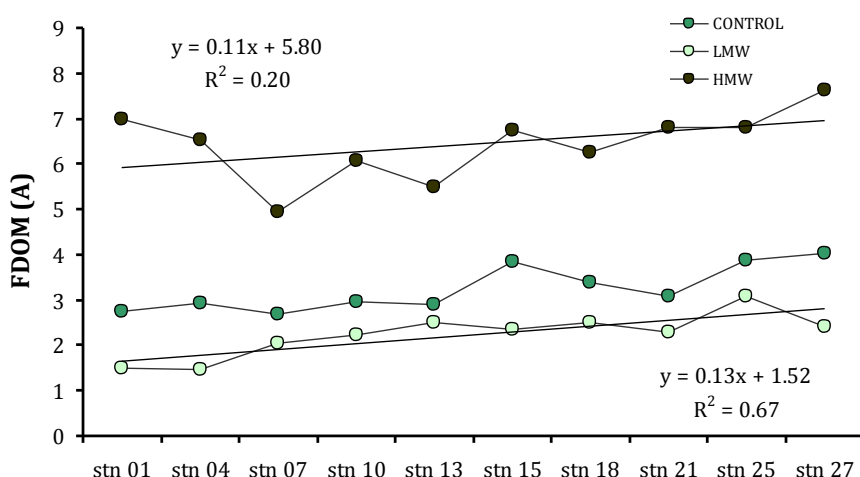


Figura 8. Evolución del fraccionamiento de la fluorescencia debida a sustancias húmicas en moléculas de alto y bajo peso molecular en el agua intermedia levantina (Levantine Intermediate Water, LIW).

Extracción en fase sólida con PPLs

La extracción en fase sólida de la MOD se ha llevado a cabo utilizando resinas comerciales poliméricas de estireno divinil benzeno (PPL). Las muestras se han

recogido en las estaciones y profundidades mostradas en la **Tabla 1**. De cada muestra se han filtrado mediante filtro GF/F 2 L de muestra, se han acidificado a pH 2 y se han hecho pasar por gravedad por la resina como se muestra en la **Figura 9**. Una vez pasada toda la muestra por la resina se ha desalinizado con MQ a pH 2 y se han congelado los cartuchos a -20 °C para su posterior análisis por FT-ICR-MS en el Laboratorio de Geoquímica Marina del Profesor Thorsten Dittmar en Oldemburgo (Alemania).



***Figura 7.** Imagen mostrando el montaje utilizado para la extracción en fase sólida de la materia orgánica disuelta usando cartuchos PPL. Foto: Alba M. Martínez Pérez*

Ultrafiltración de la MOD

En las 5 ocasiones mostradas en la **Tabla 1** se utilizó el volumen de toda la roseta de muestreo (más de 250L de agua de mar) para concentrar el material orgánico de alto peso molecular utilizando un sistema de ultrafiltración tangencial, provisto de una membrana GE de 1000 Da. El agua de mar se filtró previamente con dos filtros colocados en serie: un filtro Whatman de fibra de vidrio de 150 mm (congelado para posterior análisis de parámetros orgánicos particulados) y una cápsula PALL de polietersulfona de 0.8/0.2 μm . La ultrafiltración se llevó a cabo a presiones bajas (13–14 psi) por lo que se tardó más de 48 horas en concentrar los 250–275 L a 1.5 L. La muestra final de 1.5 L (**Figura 10**) se congeló para llevarla al Instituto de Investigaciones Marinas (CSIC) donde se pesará exactamente y se caracterizará. En el barco se ha analizado la FDOM y CDOM de las fracciones de bajo peso molecular y la muestra control, además de tomar muestras para analizar DOC y nutrientes.

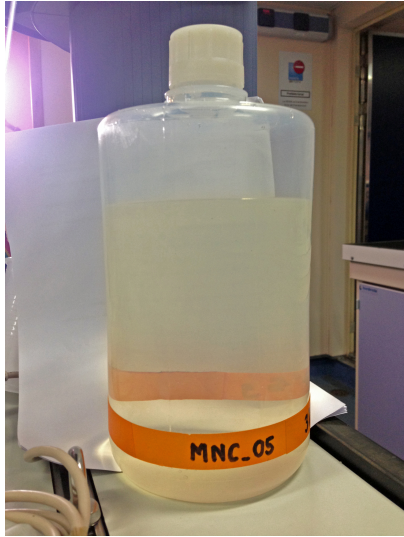


Figura 10. Concentrado de materia orgánica disuelta de alto peso molecular (>1 KDa) obtenido por ultrafiltración de 250 Litros de agua de 1050 m de profundidad en la estación 25. Foto: Mar Nieto Cid.

Experimentos de utilización de materia orgánica disuelta de alto y bajo peso molecular

Mar Nieto Cid, Laboratorio de Geoquímica Orgánica, CSIC Instituto de Investigaciones Mariñas.

Alba M. Martínez Pérez, Laboratorio de Geoquímica Orgánica, CSIC Instituto de Investigaciones Mariñas.

Minerva Espino Caballero, IOCAG, Universidad de Las Palmas de Gran Canaria

Ignacio Pérez Mazuecos, Departamento de Ecología / Instituto del Agua, Universidad de Granada

Javier Arístegui Ruiz, IOCAG, Universidad de Las Palmas de Gran Canaria

Marina Zamanillo Campos, Departamento de Biología Marina y Oceanografía, CSIC Institut de Ciències del Mar

Celia Marrasé Peña, Departamento de Biología Marina y Oceanografía, CSIC Institut de Ciències del Mar

Josep María Gasol Piqué, Departamento de Biología Marina y Oceanografía, CSIC Institut de Ciències del Mar

Durante la campaña se han llevado a cabo 4 experimentos de degradación microbiana: dos en la cuenca este (uno con Agua Intermedia Levantina y otro con Agua Profunda del Mediterráneo Oriental) y dos en la cuenca oeste (uno con Agua Intermedia Levantina y otro con Agua Profunda del Mediterráneo Occidental). En la **Tabla 2** se muestran las estaciones y las profundidades a las cuales se muestreó. Para cada experimento se recogieron 70 L de agua de mar usando una roseta de muestreo equipada con 24 botellas Niskin de 12 L. El agua se almacenó en bidones de 20 L y se siguió el procedimiento mostrado en la **Figura 11**, por el cual se generaron tres tratamientos: i) CON, incubaciones con agua filtrada a través de un filtro de 0.1 μm ; ii) LMW, bajo peso molecular, incubaciones utilizando solamente la fracción de bajo peso molecular de la materia orgánica disuelta (MOD) ultrafiltrada mediante flujo tangencial utilizando una membrana de 1KDa y iii) H+L, incubaciones mezclando las fracciones de alto y bajo peso molecular de la MOD separadas previamente por ultrafiltración en la misma proporción que en la muestra original.

Inicialmente los tres tratamientos fueron preparados en bidones de 20 L previamente lavados con ácido clorhídrico diluido para posteriormente ser distribuidos en botellas de vidrio de 250 mL previamente lavadas con ácido, las cuales se incubaron en una cámara a la temperatura in situ (13 °C) de muestreo y en oscuridad. Los experimentos duraron 6 días y se monitorizaron en cinco tiempos: al tiempo cero, a las 24h, 48h, 96h y 144h, aproximadamente. En cada tiempo de muestreo se sacrificaron tres botellas por tratamiento para los análisis de nutrientes inorgánicos (NUTS), carbono orgánico disuelto (COD), absorción (aCDOM) y fluorescencia de la materia orgánica disuelta (FDOM) y abundancia y viabilidad (BB), diversidad (DB), producción (PB),

respiración (RP) y actividad enzimática de procariotas (ENZ y BIOLOG). Estas variables fueron medidas en los tiempos de incubación recogidos en la **Tabla 3**.

Tabla 2. Resumen de las estaciones y profundidades en las que se muestreo el agua para realizar los experimentos de utilización de materia orgánica disuelta de alto y bajo peso molecular.

EXP	STN	Profundidad (m)	Masa Agua	Salinidad (PSU)	Temperatura (°C)	Oxígeno (μM)
1	02	200	LIW	39.08	15.94	187
2	09	2000	EMDW	38.74	13.82	175
3	17	2000	WMDW	38.48	13.21	178
4	22	400	LIW	38.55	13.31	159

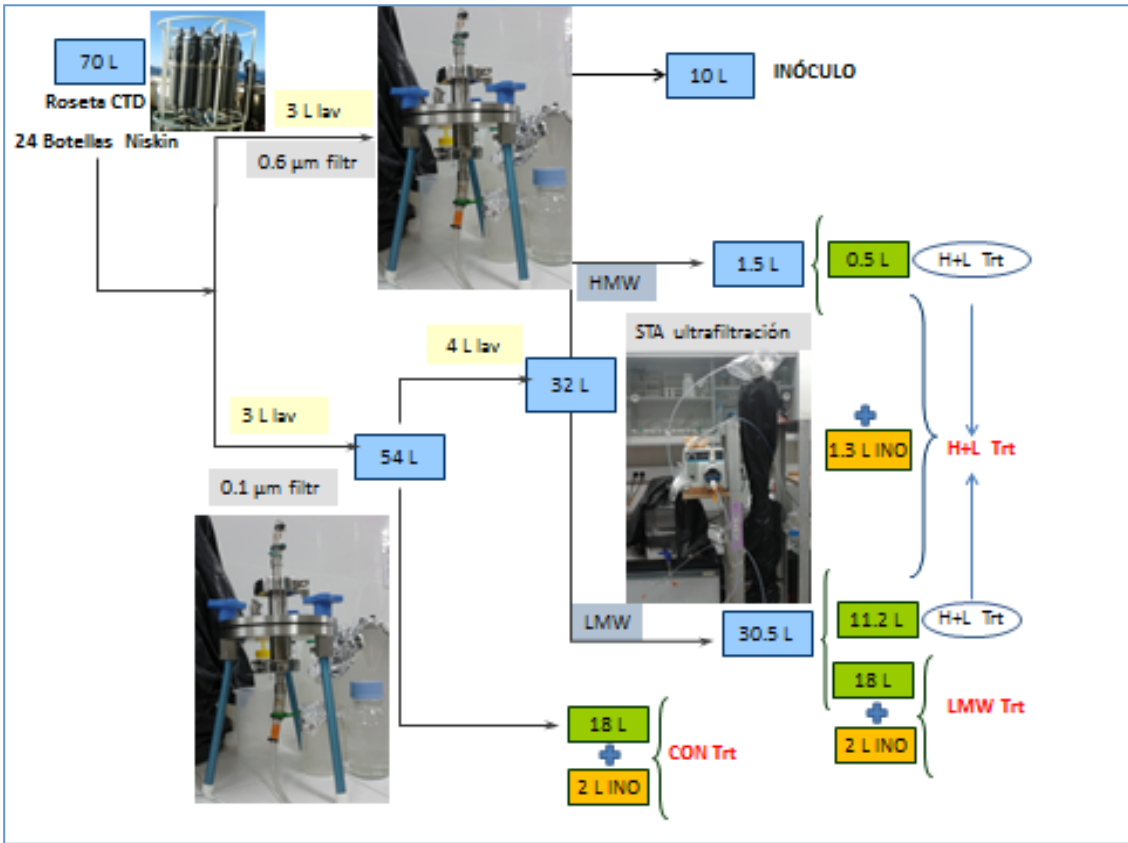


Figura 11. Ruta de los pasos seguidos para producir el inoculo bacteriano (agua filtrada por 0.6 μm) y el agua para los 3 tratamientos.

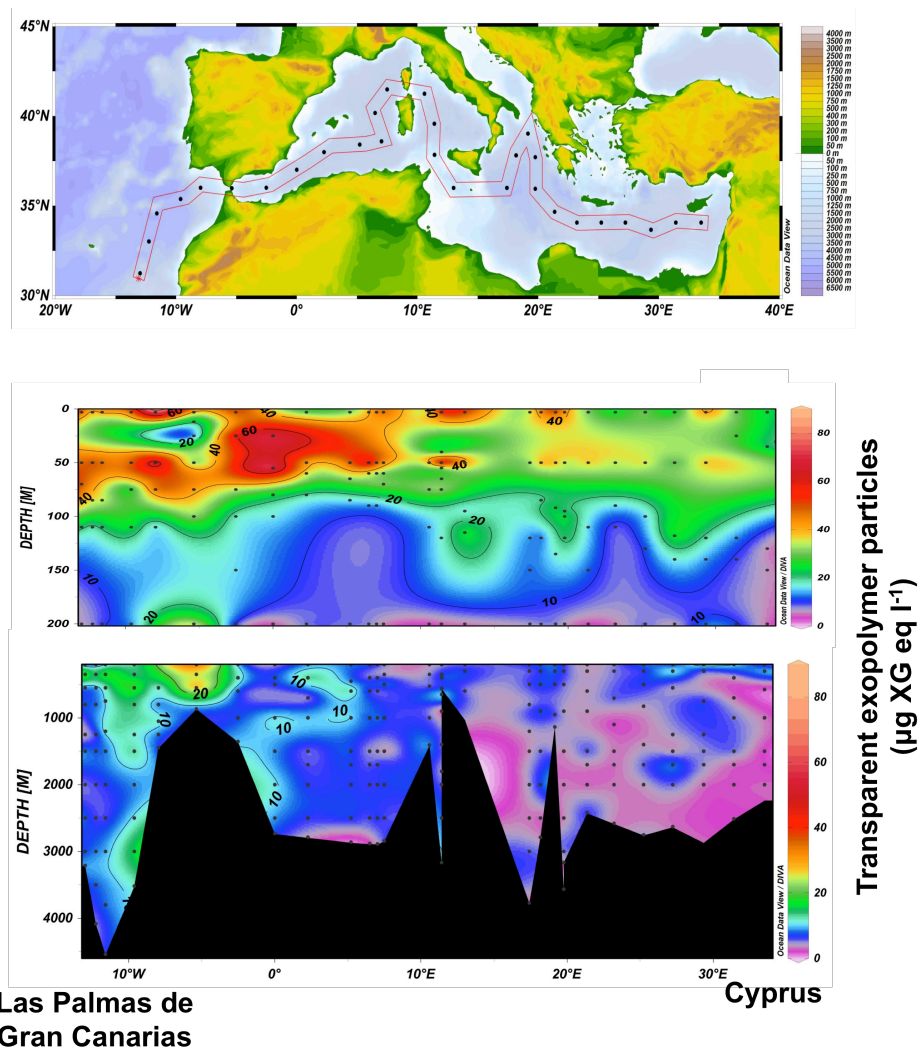
Las muestras de agua para respiración procariota de los tratamientos CON (agua filtrada por 0.1 μm) y LMW fueron incubadas por separado en botellas de demanda biológica de oxígeno.

Distribución vertical y geográfica de partículas exopoliméricas transparentes (TEP)

Ignacio Pérez Mazuecos, Departamento de Ecología / Instituto del Agua, Universidad de Granada

El estudio de los TEP tiene su importancia ya que son producidos por el o bien por el fitoplancton, mayormente cuando se encuentra en condiciones de estrés (por ejemplo estrés lumínico o estrés por escasez de nutrientes), o bien por los microorganismos. Sus propiedades fisicoquímicas (por ejemplo son partículas bastante pegajosas) hacen su estudio muy interesante a nivel ecológico ya que pueden favorecer la agregación de la materia orgánica estimulando el flujo descendente de carbono particulado desde la superficie hasta el océano profundo.

En total, 29 estaciones fueron muestreadas desde 3 m hasta el fondo recogiendo alrededor de 710 muestras, de las cuales alrededor de 240 muestras son de la zona epipelágica, 185 muestras del mesopelágico y alrededor de 280 muestras de la zona batipelágica (ver figura siguiente de la distribución de TEPS)



Experimentos de Generación de TEP

Durante la campaña se hicieron 3 experimentos de generación de TEPs por microorganismos: dos experimentos recogiendo agua levantina intermedia (estaciones 4 y 19) y un experimento del DCM (estación 6).

Los objetivos de estos experimentos fueron: 1) ver el efecto de los virus sobre la generación de TEP, se hicieron dos tratamientos uno con + virus (filtrado por $0.2\ \mu\text{m}$ + 25 % inóculo prefiltrado $1\ \mu\text{m}$) y otro con – virus (filtrado por $30\ \text{KDa}$ + 25 % inóculo prefiltrado $1\ \mu\text{m}$); y 2) ver el efecto de la adición de nutrientes sobre la producción de TEPs, se hizo dos tratamientos uno con una fuente de carbono lábil (+ Glucosa) y otro con nutrientes inorgánicos, nitrógeno y fósforo (+PN).

Para cada experimento se tomaron muestras para medir los siguientes parámetros: producción bacteriana ($180\text{ producciones} = 3 + 1$), concentración de TEP (63 muestras), nutrientes disueltos y totales (72 muestras de cada uno), carbono disuelto y total (72 muestras de cada uno), abundancia de procariotas (180 muestras) y virus (180 muestras).

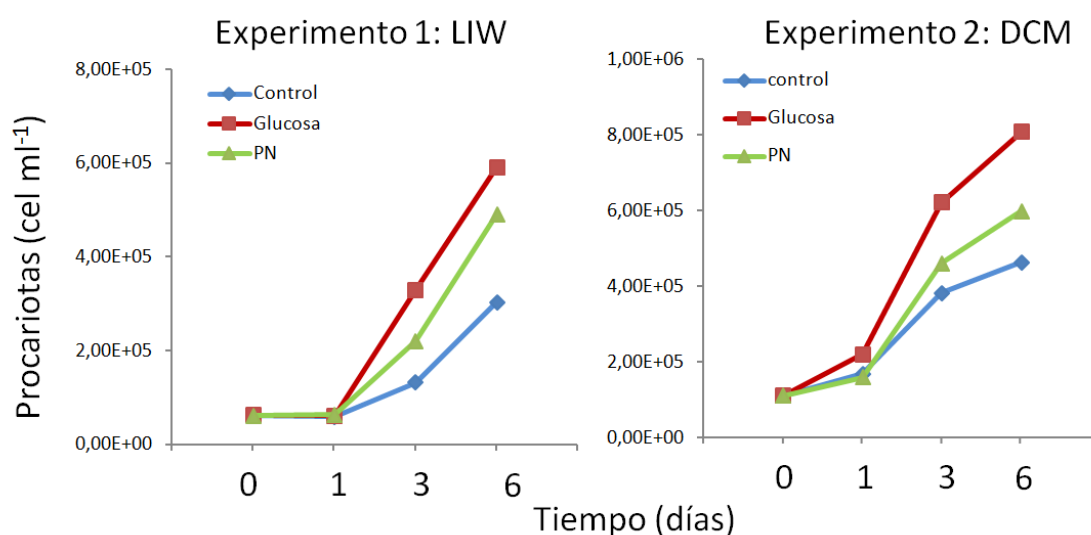


Figura 1. Cambios temporales en la abundancia de procariotas en los diferentes tratamientos de adición de nutrientes.

En los tratamientos de adición de nutrientes, especialmente glucosa, fue detectado un mayor aumento de abundancia de procariotas a partir del tercer día.

Recogida de muestras para la actividad *caspasa*

Las caspasas son enzimas responsables de desencadenar la muerte celular cuando las células están sometidas bajo algún tipo de estrés. Se ha observado que la producción de TEP por *Trichodesmium* puede estar relacionado con la expresión de estas enzimas (Berman-Frank et al 2007) ya que ambos procesos tienen lugar cuando el fitoplancton

esta bajo condiciones de estrés. Nuestro objetivo es tomar muestras de fitoplancton en condiciones naturales para relacionar la actividad caspasa que expresan la comunidad algal con la cantidad de TEPs que encontramos en el medio marino.

Se recogieron muestras de la zona epipelágica, de las mismas profundidades de donde se recogieron muestras de TEPs. En total, se recogieron 58 muestras (7 estaciones) para medir la actividad caspasa de la comunidad fitoplanctonica.

Clorofila a (por fluorimetría)

Nauzet Hernández Hernández , IOCAG, ULPGC

Se tomaron muestras a 6 profundidades (hasta 200 m) en todas las estaciones para el análisis de clorofila a y feopigmentos por el método fluorimétrico. Se filtraron 500 mL de agua a través de filtros de fibra de vidrio (Whatman GF/F), que se almacenaron congelados y en la oscuridad hasta su posterior análisis en el laboratorio. Posteriormente los pigmentos se extraen en acetona al 90% durante 24 h en condiciones refrigeradas y la fluorescencia se mide usando un fluorómetro Turner Designs. Estos datos se usarán en primera instancia para calibrar el fluorómetro del CTD hasta tener las medidas más precisas de clorofila a obtenidas mediante HPLC (ver debajo)

Pigmentos fotosintéticos (por HPLC)

X. Antón A. Salgado, Laboratorio de Geoquímica Orgánica, CSIC Instituto de Investigaciones Mariñas.

Se recogieron muestras para el análisis de pigmentos fotosintéticos del fitoplancton (clorofilas y carotenoides) por cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) en 6 profundidades distribuidas en la zona epipelágica de las 29 estaciones muestreadas (en total, 174 muestras). El agua para realizar estos análisis se recogió en botellas de polycarbonato de 2L revestidas de cinta negra para evitar el contacto de las muestras con la luz natural en el momento de su recogida de las botellas Niskin. El material a analizar se recolectó sobre filtros GF/F de 25 mm de diámetro empleando una bomba de vacío Millipore y una rampa con seis puestos de filtración. La presión de filtrado no excedió en ningún caso los 0.03 MPa. El volumen de agua filtrado fue de 2 L. En aquellos casos en los que la filtración excedió los 60 minutos, se paró la filtración y se anotó el volumen no filtrado. La filtración se detuvo en el momento en que los filtros quedaban en seco. Estos se doblaron a la mitad con ayuda de pinzas Millipore, se secaron con papel de filtro, se guardaron en bolsas zip individuales convenientemente rotuladas y se congelaron a -80°C hasta el momento de su análisis en el Grupo de Fotobiología y Pigmentos de Fitoplancton del Instituto de Investigaciones Marinas (CSIC), liderado por el Dr. J.L. Garrido.

Phytoplankton abundance (Flow Cytometry)

Mathilde Duggene – Mediterranean Institute of Oceanography (MIO), France

Minerva Espino Caballero – IOCAG, ULPGC

Javier Arístegui – IOCAG, ULPGC

Real time analyses of phytoplankton abundances were performed along the whole cruise, combining a FACScalibur flow cytometer and a Cytosense flow cytometer. This allowed identification of the main phytoplankton groups, spanning from pico- to micro-phytoplankton. Fresh water samples from 6-8 depths, down to 200 m, were analysed immediately after collection at each of the 29 stations. Populations were identified from bivariate plots of forward and sideward scatter, red, orange and green fluorescence.

Additionally, automated high-frequency (every 30 min) analysis of continuous surface seawater (3 m) was performed with the Cytosense during navigation between stations. The Cytosense cytometer allowed the discrimination of 6 different phytoplankton clusters: cyanobacteria (*Phrochlorococcus* and *Synechococcus*), picoeukaryotes, nanoeukaryotes, cryptophytes, and a heterogeneous cluster of microphytoplankton. The FACScalibur allowed the discrimination of 3 different groups: cyanobacteria (*Phrochlorococcus* and *Synechococcus*) and picoeukaryotes. The cross-check comparisson between the two cytometers gave evidence of a clear underestimation of *Phrochlorococcus* and *Synechococcus* by the Cytosense, but also an underestimation of picoeukaryotes by the FACScalibur. Thus, the combination of both systems were necessary to obtain reliable abundances.

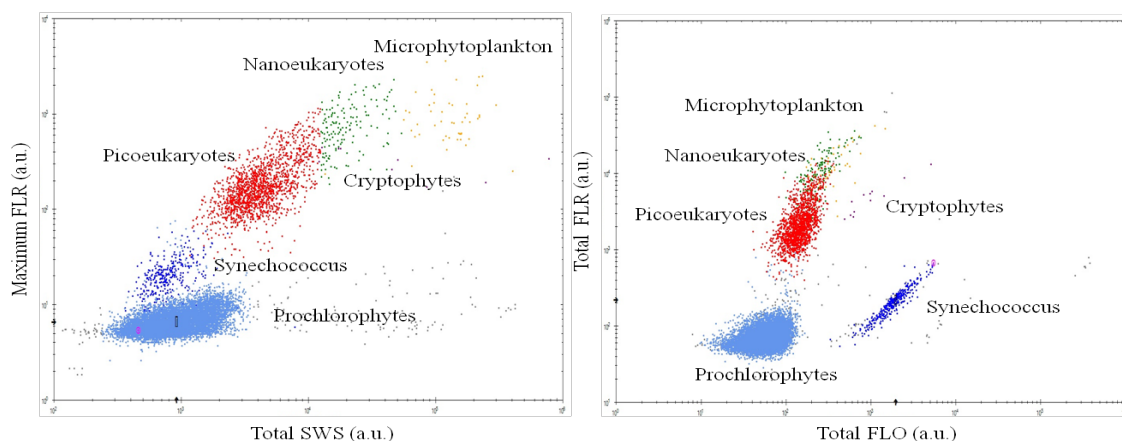


Fig. 1: Cytogram of Total SWS vs Maximum FLR and Total FLO vs Total FLR from the Cytosense showing the 6 groups of phytoplankton: Prochlorophytes (blue dots), Synechococcus (Cyan dots), Picoeukaryotes (red dots), Nanoeukaryotes (green dots), Cryptophytes (purple dots) and Microphytoplankton (yellow dots).

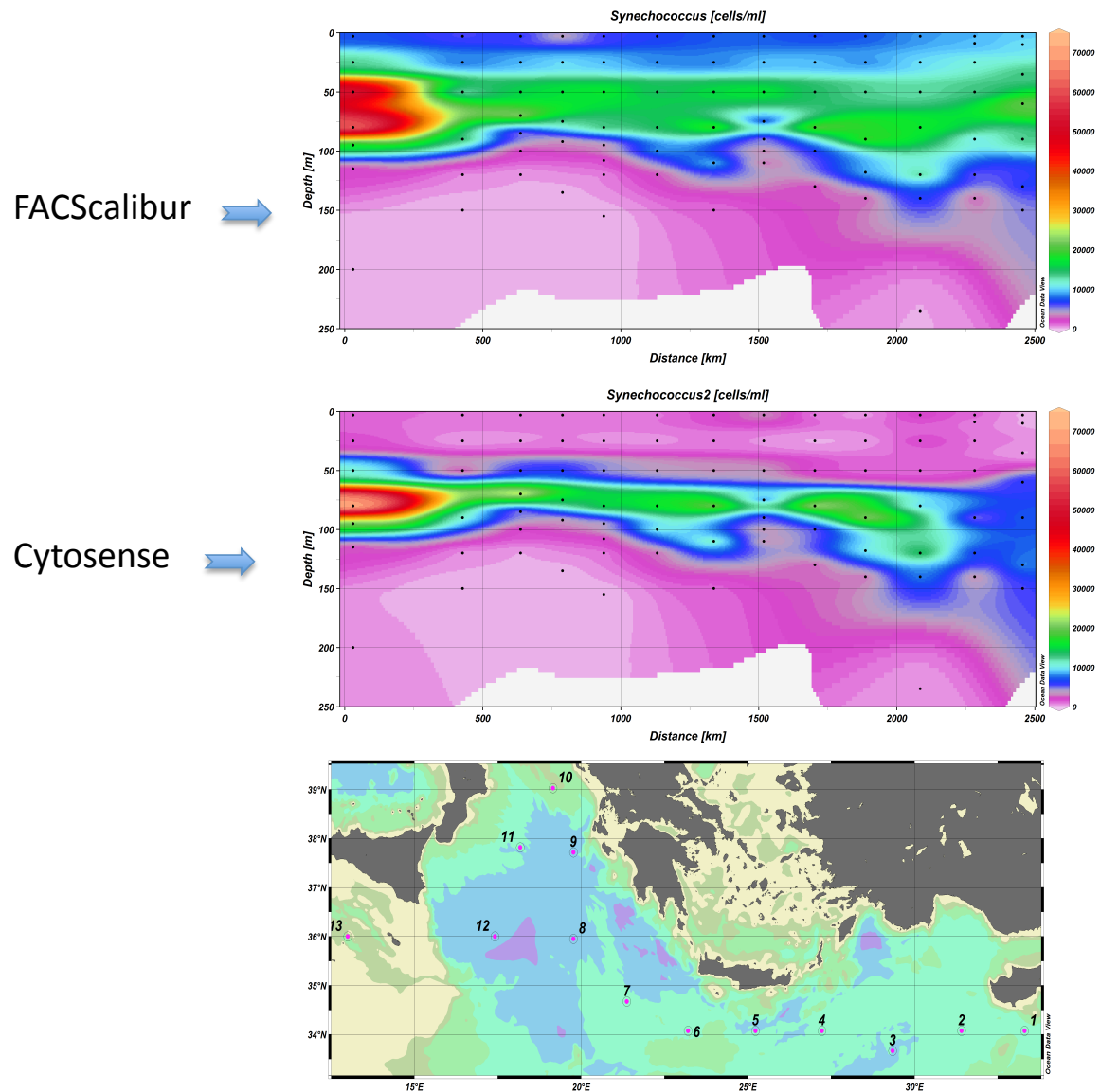


Fig. 2: Comparisson of the distribution of *Synechococcus* cells in the eastern Mediterranean, obtained with both cytometers, showing a clear underestimation in the upper layers with the Cytosense .

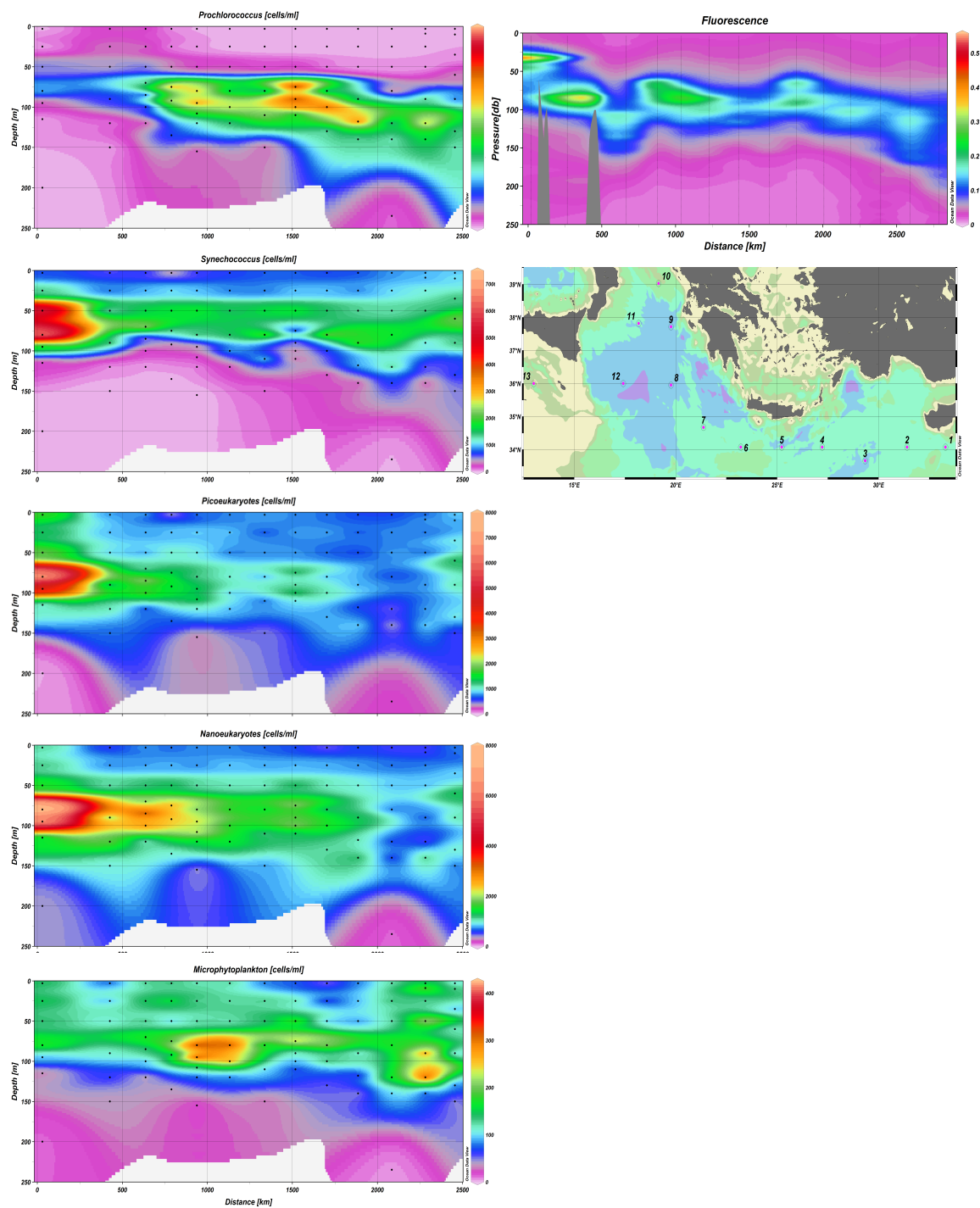


Fig. 3: Distribution of the main phytoplankton clusters in the eastern Mediterranean. Cyanobacteria obtained with the FACSclibur. Picoeukaryotes, Nanoeukaryotes and Microplankton obtained with the Cytosense.

The analysis of all the Mediterranean stations together highlights an important regime shift between basins as well as some sub-basin patterns due to mesoscale structures (e.g. Lerapetra eddy). Prochlorophytes largely accounted for the DCM in the eastern basin, around 100-150 m depth, whereas in the western Mediterranean *Synechococcus* and larger phytoplankton dominated both in the DCM and mixed layer (50-100 m depth) (Fig. 4).

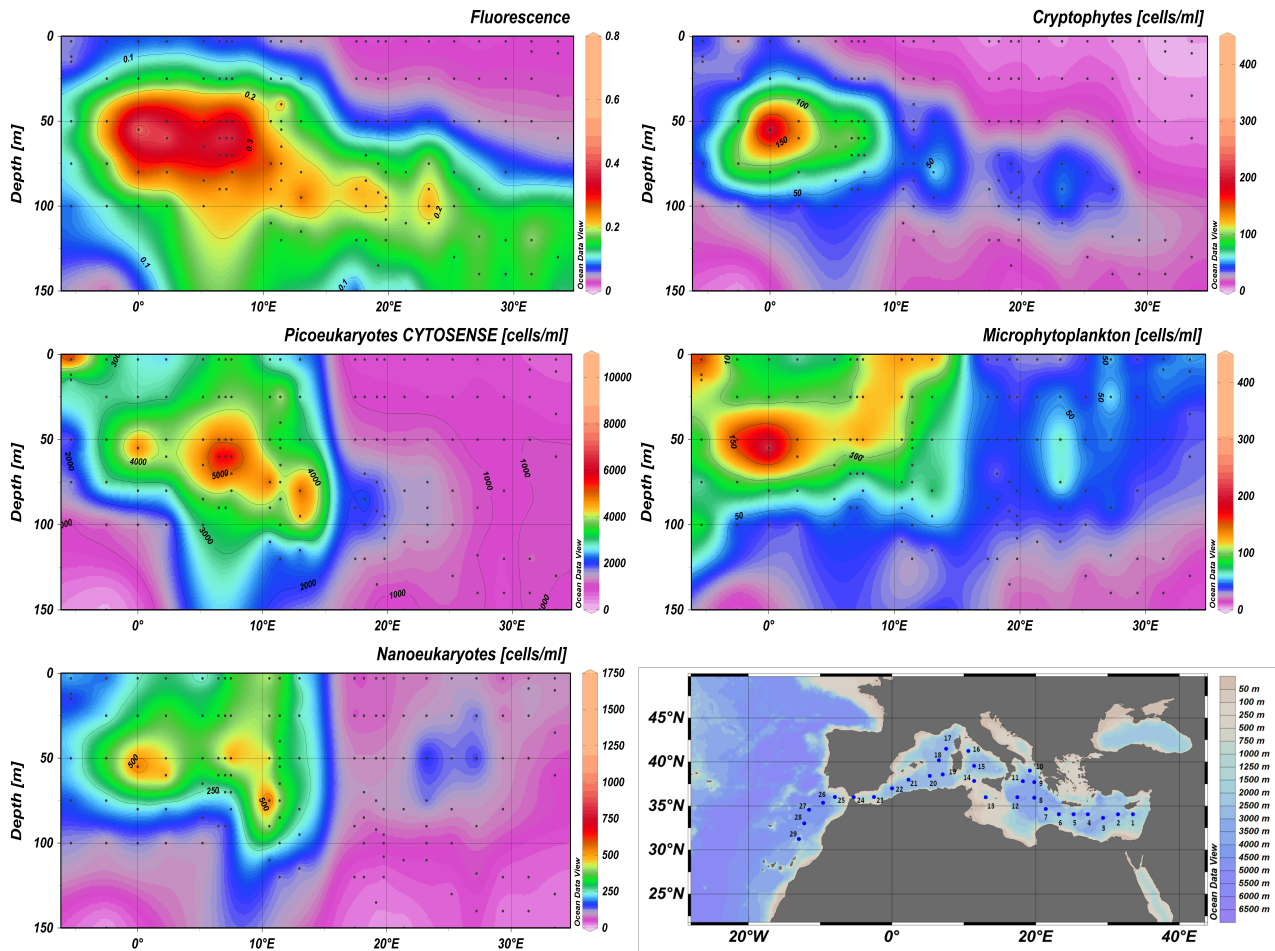


Fig. 4: Distribution of phytoplankton groups obtained with the Cytosense across the the two Mediterranean basins.

Bacterial abundance and viability (Flow Cytometry)

Minerva Espino Caballero – IOCAG, ULPGC

Javier Aristegui – IOCAG, ULPGC

Bacterial abundance and viability were performed at all stations and depths (down to the seafloor) across the Mediterranean Sea and eastern North Atlantic. Samples for bacteria enumeration were fixed with paraformaldehyde before deep frozen at -80C, until analysed a few hours latter. Samples were stained with SYBR Green. High and Low NA bacteria clusters were identified from bivariate plots of green fluorescence (FL1) vs side scatter and FL1 vs red fluorescence (FL3).

Viable and damaged cells were estimated in non-fixed samples after the nucleic acid double-staining (NADS) protocol. NADS +, green cells (assumed to be active, with intact membranes), and NADS-, red cells (assumed to be inactive, with compromised cell membranes) were identified by simultaneous double staining with a membrane-permeant (SYBR Green) and impermeant (propidium iodide) probe. Immediately after collecting the samples, they were incubated in the dark with the probes for 15 min. NADS + and NADS- cells were enumerated by flow cytometry and differentiated in a scatter plot of FL1 (green) - FL3 (red emission after blue-light excitation).

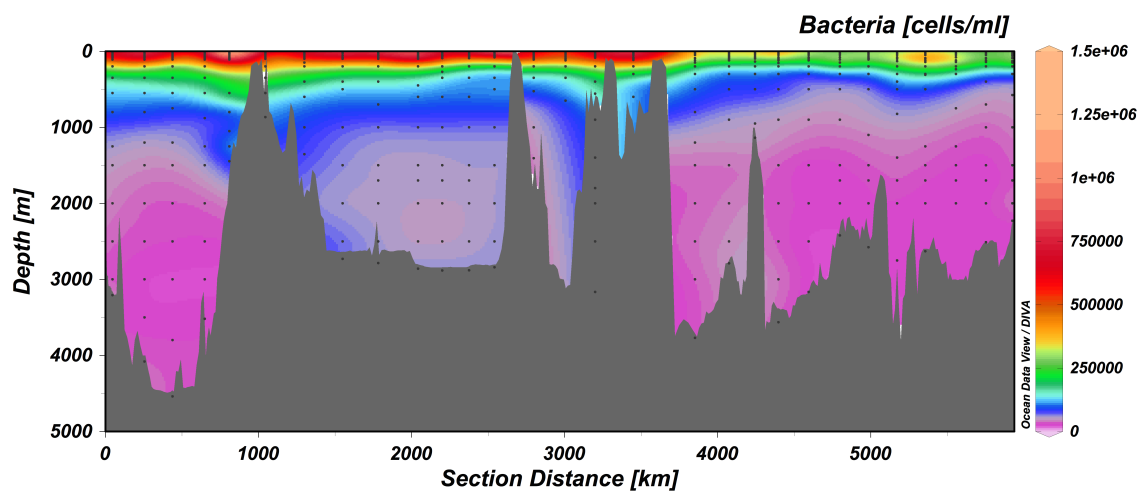


Fig. 1: Distribution of total bacteria across the the two Mediterranean basins and eastern North Atlantic.

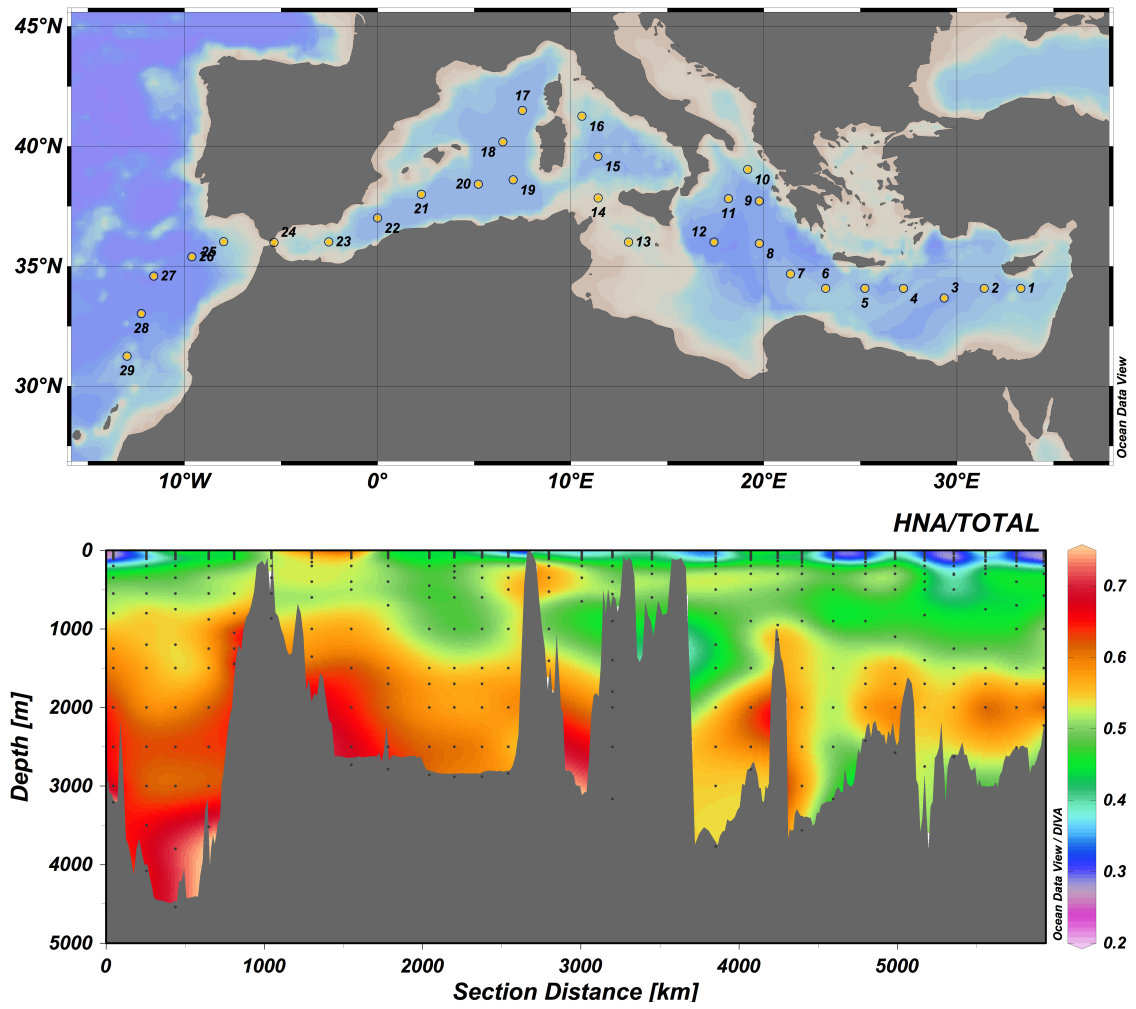


Fig. 2: Distribution of the ratio of High NA bacteria to total bacteria across the the two Mediterranean basins and eastern North Atlantic.

Actividad respiratoria microbiana e índices R/ETS.

Isabel Baños y Nauzet Hernández

IOCAG, Universidad de Las Palmas de Gran Canaria

Objetivos

- Evaluar el impacto del agua levantina intermedia (Levantine Intermediate Water, LIW) sobre el metabolismo de las comunidades microbianas a su paso y mezcla por el Mediterráneo y Atlántico Norte.
- Estudiar la relación entre la respiración de la comunidad (R) y la actividad enzimática asociada a la cadena respiratoria (ETS); cálculo de índices R/ETS.

Estrategia de muestreo:

En todas las estaciones se han realizado dos tipos de medidas respiratorias : i) determinación de tasas respiratorias por cambios en la concentración de oxígeno (R), ii) determinación de la respiración potencial a partir de la actividad enzimática de la cadena respiratoria (ETS).

El estudio de la respiración (R) se llevó a cabo en tres profundidades clave de la columna de agua: máximo de salinidad (correspondientes a las aguas levantinas), mínimo de oxígeno y Máximo Profundo de Clorofila (Deep Chlorophyll Maximum, DCM). De manera adicional se midieron tasas respiratorias en las profundidades que se muestran en la Tabla.1. Las medidas fueron obtenidas mediante un espectrómetro de masas acoplado a una membrana (MIMS) (fig.1). La actividad ETS se midió en todas las profundidades muestreadas de la columna de agua.

Etiquetas	DCM	minO ₂ y max sal	minO ₂	max sal					
st.01	st.02	st.03	st.04	st.05	st.06	st.07	st.08	st.09	st.10
2000m	2000m	2000m	2000m	2000m	2000m	2000m	2000m	2000m	200m
1700m	1500m	1500m	1500m	1700m	1500m	900m	900m	900m	950m
1500m	1000m	1250m	1250m	825m	1100m	600m	300m	95m	200m
1000m	700m	750m	550m	500m	705m	300m	200m	80m	85m
575m	400m	300m	300m	300m	300m	200m	500m	3m	
300m	200m	200m	200m	200m	200m	110m	300m		
200m	120m	120m	118m	100m	90m	3m	200m		
150m	25m	50m	3m	80m	75m		100m		
130m	3m	3m		3m	3m		3m		
60m									
35m									
10m									
3m									
st.11	st.12	st.13	st.14	st.15	st.16	st.17	st.18	st.19	st.20
2000m	2000m	300m	400m	1000m	525m	1000m	1000m	1000m	1000m
900m	1200m	95m	40m	650m	60m	350m	400m	400m	450m
120m			75m			60m	60m	55m	60m
st.21	st.22	st.23	st.24	st.25					
1000m	1000m	1000m	550m	1250m					
400m	400m	400m	75m	800m					
55m	75m								

Tabla 1. Estadillo de profundidades en las cuales se han medido tasas respiratorias mediante espectrometría de masas. Las profundidades de color verde, lila, rojo y azul corresponden a las profundidades del Máximo de Clorofila Profundo, mínimo de O₂ que coincide con el máximo de sal, mínimo de O₂ y máximo de sal, respectivamente

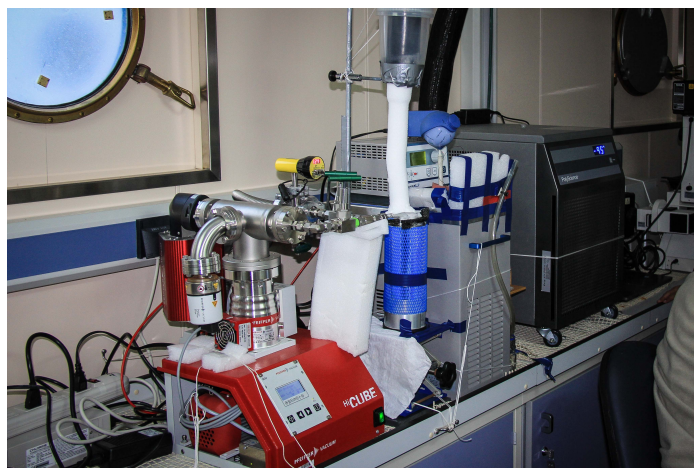


Figura 1. Espectrómetro de masas

Metodología de muestreo

1. Estimación de la respiración (R): la respiración se estimó a partir del descenso en la concentración de oxígeno en el interior de tubos Exetainer especiales para el estudio de gases (fig.2) mediante espectrometría de masas a tiempo 0, 24 y 48h. Los exetainer se rellenaban y homogeneizaban con el agua de sus respectivas profundidades. Por cada tiempo de medición, se incubaron en oscuridad 3 viales en baños termostáticos cuya temperatura era próxima a la temperatura *in situ* de la muestra. Las iniciales se medían de inmediato por espectrometría de masas (Kana et al. 1994) y transcurridas las 24 y 48h, las muestras incubadas. Las concentraciones de oxígeno obtenidas se corrigieron de acuerdo a un estándar hecho con agua de mar sintética de temperatura y salinidad conocida.



Figura 2. Exetainer empleados para medir oxígeno

2. Respiración potencial del microplancton (ETS): La respiración del microplancton se estimará a partir de la actividad enzimática respiratoria del sistema de transferencia de electrones (actividad ETS; Packard, 1985). Debido a que la actividad del ETS se estima bajo saturación de sustrato, con esta técnica medimos la respiración potencial del microplancton. Para obtener datos sobre respiración real a partir de ETS, se utilizarán los índices R/ETS obtenidos. Se recogieron muestras de agua en toda la columna de

agua, 3 L para los primeros 200 m de profundidad y 8 L desde los 200 m hasta el fondo. Estas muestras fueron filtradas a través de filtros Whatman GF/F 25 mm para su concentración. Los filtros fueron introducidos en crioviales Eppendorf, los cuales se sumergieron en nitrógeno líquido durante varios segundos (flash freeze) y a continuación fueron almacenados a -80°C hasta su análisis en el laboratorio del Grupo de Oceanografía Biológica en la ULPGC.

Resultados preliminares:

No mostramos datos correspondientes a la actividad ETS dado que requieren de un análisis especializado en tierra. En lo que respecta a los datos obtenidos mediante espectrometría de masas, aún requieren de una corrección detallada. Sin embargo, a continuación mostramos un adelanto de la evolución de la concentración de oxígeno para el Máximo de Clorofila Profundo (DCM) en las estaciones 11, 14, 15 y 18 a t 0, 24 y 48h. (Fig.3)

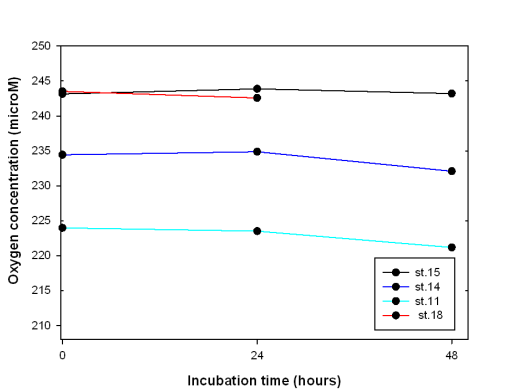


Figura 3. Descenso en la concentración de oxígeno en el interior de exetainer medidos por espectrometría de masas a t 0, 24 y 48h de incubación en la estaciones 11, 14, 15 y 18.

Los resultados obtenidos (Tabla 2) muestran que las tasas respiratorias a t24h son bajas, en torno a 0,02 y 0,04 $\mu\text{mol/L.h}$ para las estaciones 11 y 18, respectivamente. Para las estaciones 14 y 15, no se aprecian descensos en la concentración de oxígeno. Transcurridas las 48h de incubación las tasas obtenidas para las estaciones 11 y 14 alcanzan los 0,06 y 0,05 $\mu\text{mol/L.h}$, mientras que la estación 15 no muestran cambios en la concentración de oxígeno.

Respiraciones ($\mu\text{mol/L.h}$)				
Tiempos	st.11	st.14	st.15	st.18
t0-24h	0,02	-0,02	-0,03	0,04
t0-48h	0,06	0,05	0,00	-

Tabla 2. Tasas respiratorias ($\mu\text{mol/L.h}$) a tiempo 24 y 48h de incubación obtenidas en la DCM para las estaciones 11, 14, 15 y 18.

Bibliografia

- Kana TM., Darkangelo C., Hunt MD., Odlham JB., Bennett GE., Cornwell JC (1994). Membrane inlet mass spectrometer for rapid high-precision determination of N₂, O₂ and Ar in environmental water samples. Anal. Chem, 23:4166-4170.
- Packard. T.T. (1985) Measurement of electron transport activity of microplankton. Adv. Aquat. Microbiol., 3: 207-261.

Actividad y diversidad de organismos fijadores de N₂ en la columna de agua – relación con la materia particulada.

Nauzet Hernández

IOCAG, Universidad de Las Palmas de Gran Canaria

Objetivos

- a) La estimación de las tasas de fijación de N₂ en la zona fótica y afótica.
- b) La identificación y cuantificación de los organismos responsables de este proceso.
- c) La cuantificación de la Materia Orgánica Particulada (POM) en toda la columna de agua.

Metodología.

Para medir **fijación de N₂** se utilizó el método de trazador isotópico propuesto por *Montoya et al. 1996*. Este método mide la transferencia N₂ atmosférico al material nitrógeno orgánico particulado (PON) del plancton. Para ello se recogieron muestras en cuatro profundidades: Máximo Profundo de Clorofila (DCM), mínimo de oxígeno, Agua Mediterránea Profunda (MDW) y en el Agua Intermedia Levantina (LIW). A las muestras (una inicial y dos réplicas, por profundidad) se le inyectó 5 ml de nitrógeno marcado isotópicamente (¹⁵N₂), y fueron incubadas en condiciones de temperatura y de luz que simulan las *in situ*, durante 24 h. Tras el período de incubación, las muestras se concentraron en filtros de fibra de vidrio Whatman GF/F, y se conservaron a -20°C. La muestra destinada a ser el tiempo inicial recibió el mismo tratamiento a excepción de la incubación. Las muestras serán analizadas con un analizador elemental acoplado a un espectrómetro de masas (EA-IRMS) en tierra una vez acabe la campaña en el MIO, Marsella.

La **identificación/cuantificación de los organismos diazótrofos** se llevará a cabo mediante la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qPCR) aplicando sondas específicas para detectar el gen *nifH* de distintos grupos de diazótrofos. El *nifH* es el gen que codifica la nitrogenasa, la enzima que hace posible la fijación de N₂. Para ello se recogieron 4L de muestra a cuatro profundidades: DCM, mínimo de oxígeno, MDW y LIW. Las muestras fueron filtradas a través de un filtro de policarbonato de 0.2 µm de poro, tras lo cual se ultracongelaron en nitrógeno líquido (“flash-freeze”) y se conservaron a -80 °C. En tierra y una vez finalice la campaña, aplicaremos el ensayo qPCR en los laboratorios de la Universidad de Massachusetts Dartmouth (EEUU).

Para la **cuantificación de la POM** se filtraron 2 L por profundidad en la zona fótica y 4 L en la afótica (a partir de 200 m), en todas las estaciones y profundidades. Las muestras se concentraron en filtros de fibra de vidrio Whatman GF/F y se conservaron a -20°C. Se analizarán mediante combustión a alta temperatura en un analizador elemental (CHN, Perkin Elmer).

Los resultados se interpretarán apoyándose además en otros datos recogidos durante la campaña, como los perfiles CTD, y la composición y labilidad de materia orgánica disuelta (DOM, estudiada por el grupo del IIM-CSIC).

Referencias

Montoya, J.P., Voss, M., Kahler, P., Capone, D.G., 1996. A Simple, High-Precision, High-Sensitivity Tracer Assay for N₂ Fixation. *Applied and Environmental Microbiology* 62, 986–993.

Prokaryotic Activity at In Situ Pressure Using Pressure Retaining Samplers

Thomas Reinthaler, Chie Amano

Department of Marine Biology, University of Vienna

Herman Boekel

Department of Marine Technology, Royal Netherlands Institute for Sea Research

Introduction

About 75% of the ocean is deeper than 200 m, however, most concepts on the interaction between the physical and chemical environment and the biota are derived from the relatively thin ocean surface layer. Moreover the link between prokaryotic activity and biogeochemistry in the dark ocean is not firmly established despite recent studies that highlight the role of *Bacteria* and *Archaea* in the cycling of organic and inorganic matter in the dark ocean (Baltar *et al.*, 2009a; Herndl *et al.*, 2005b; Reinthaler *et al.*, 2006). Among others, the observation that the most important source of substrate for prokaryotes, i.e. DOC, is not depleted (Barber, 1986) led to the longstanding view that microbes in the deep are dormant or even dead (Jannasch and Wirsen, 1973). This paradigm is challenged, however, by recent evidence suggesting that prokaryotes in the dark ocean are as active (or even more active) as compared to the sunlit surface (Kirchman *et al.*, 2007; Reinthaler *et al.*, 2006; Varela *et al.*, 2008).

Despite the major insights gained from studies on microbial activity in the surface ocean, knowledge on the microbial processing of organic matter and nutrients in the dark ocean is still in its infancy due to the lack of data. For this reason the IPCC called attention to the fact that it is not possible to parameterize prokaryotic activity for an enhanced understanding of the global ocean carbon cycle (Intergovernmental Panel on Climate Change, 2001) and an interdisciplinary workshop of experts on integrating biogeochemistry and ecosystems in a changing ocean emphasized to study the interactions of the physics, chemistry and biology on an interdisciplinary basis (IMBER IMBIZO <http://www.imber.info/IMBIZO1.html>).

Research on the activity of prokaryotes at in situ pressure started in the last century and various high pressure retaining devices allowing to sample seawater in the dark ocean have been developed by different groups. The resulting data on the effect of pressure of the prokaryotes from these devices is controversial at best. In collaboration with the Netherlands Institute for Sea Research we set out to develop a high pressure retaining sampler building on the experience gained in the past with the major goal to design a simple device for easy handling and cleaning and that allows to follow conventional incubation protocols.

Objectives

1. To study the heterotrophic production of prokaryotes at in situ pressure using the pressure retaining samplers in comparison to decompressed samples from Niskin bottles.

2. To compare the ectoenzyme activity of alkaline-phosphatase and leucine-aminopeptidase incubated under pressure and depressurized conditions.

Methods

Daily sampling in the bathypelagic (1000-4000 m depth), and occasionally in the mesopelagic (200-1000 m depth) was done using 18 pressure retaining samplers (see table 1). All parts of the high pressures samplers (HPS) in contact with seawater samples are made from titanium and the main sampling cavity is lined with a chemically inert liner holding a volume of 40 mL. A total of 100 samplers were available. Six samplers each were mounted in racks latched on the CTD frame. Each rack is equipped with an electric motor that moves a metal bar to open and subsequently close the bottles. The battery power and trigger electronics for the motors are housed in a separate unit that itself is fed by electronic signals from the CTD deck unit.

Prokaryotic heterotrophic production measurements from the HPS systems

Microbial heterotrophic production was measured by radio assaying [^3H]-Leucine incorporation into prokaryotic cells. To the live samples 2 mL of Milli-Q water was injected into the port of the sampler with a 10 mL luer-lock syringe and a sterile needle. Subsequently 20 μL of tritiated leucine was pipetted with a long capillary pipette tip onto the surface of the piston in the HPS samplers (5 nM [^3H]-leucine final concentration, specific activity 112 Ci mmol^{-1} , NEN). Care was taken to remove all air in the upper part and the valve of the HPS. All these precautions were taken to prevent the loss of leucine while opening the samplers at depth.

Thirty minutes before deployment the samplers were assembled and loaded with the tracer. Three HPS samplers served as blank incubations and 2 mL of 37% formol was added (1.8% final concentration) to the top of the piston. The back of the HPS was filled with ice cold (4°C) Milli-Q and closed with retarder valves. Subsequently the samplers were mounted on the CTD. Before deployment and after retrieval of the CTD the diameter of the samplers was measured to estimate the pressure in the samplers. Before incubating the HPS triplicate samplers were slowly decompressed to serve as a material control. All samplers were incubated at in situ temperature ($\pm 1^\circ\text{C}$) for 24h.

Incubations were terminated by evacuating the labeled seawater from the HPS into conical plastic tubes (Greiner BioOne) using a special apparatus and formol was added to the live incubations. Samples and blanks were filtered through 0.2- μm polycarbonate filters (Whatman Nuclepore, 25 mm filter diameter) supported by cellulose acetate filters (Millipore, HAWP, 0.45- μm pore size). Subsequently, the samples were extracted twice with 5% ice-cold trichloroacetic acid for 5 minutes each. After rinsing the filters with ultrapure water the filters were dried, 8 ml of scintillation cocktail (FilterCount, Canberra-Packard) added and after about 18 h, counted on board in a liquid scintillation counter (Perkin Elmer Tricarb). The instrument was calibrated with internal and external standards.

Cleaning procedure

At the end of the incubations the samplers disassembled and the parts were briefly flushed with water. The single parts of the samplers were washed in a dish washer at 75°C for 45 min using reverse osmosis water. Subsequently the samplers were sonicated for 30 min in 0.1M HCL and thereafter 2 times 30 min in Milli-Q water.

Prokaryotic heterotrophic production from Niskin bottles

Samples for prokaryotic heterotrophic production were also taken from conventional Niskin bottles. Triplicate life and 2 control samples were incubated in conical plastic tubes (Greiner BioOne) and liners under the same conditions as the HPS. Microbial heterotrophic production was measured by incubating 40 mL of seawater in triplicate with 5 nM [³H]-leucine (final concentration, specific activity 112 Ci mmol⁻¹, NEN) in the dark at in situ temperature (±1°C) for 24 h. Duplicate formaldehyde-killed blanks were treated in the same way as the samples. Incubations were terminated by adding formaldehyde (2% final concentration) to the samples. Samples and blanks were filtered through 0.2-µm polycarbonate filters (Whatman Nuclepore, 25 mm filter diameter) supported by cellulose acetate filters (Millipore, HA, 0.45-µm pore size). Subsequently, the filters were rinsed twice with 5% ice-cold trichloroacetic acid and twice with Milli-Q. Filters were dried, 8 ml of scintillation cocktail (FilterCount, Canberra-Packard) added, and after about 18 h counted on board in a liquid scintillation counter (Perkin Elmer Tricarb).

Extracellular enzyme activity and the influence of pressure

Extracellular enzymatic activity was measured by fluorogenic substrate analogues, 4-Methylembelliferone phosphate (MUF-P) and L-Leucine-7-amido-4-methylcoumarin hydrochloride (MCA-L), to estimate alkaline phosphatase and leucine aminopeptidase activities, respectively.

Water Samples (297.5 µL) taken from regular Niskin bottles were pipetted into 96 well black plates (Nunc) and mixed with 2.5 µL of 12 mM MUF-P or 60 mM MCA-L (final conc. 100 µM and 500 µM respectively). The samples were incubated in the dark at in situ temperature for 48 h. During the incubation, fluorescence was measured at 12 and 24 h.

For HPS samples, the substrates were added into HPS samplers before the downcast at a concentration as mentioned above. Samples in HPS bottles were collected into 50 mL tubes then 300 µL of samples were transferred into the well plate. Compressed and decompressed samples were incubated in the HPS bottles in the dark and in situ temperature for 24 h.

Fluorescence of 4-Methylembelliferone (MUF) and 7-Amino-4-methylcoumarin (MCA) were detected using a Modulus plate reader (Tuner Biosystems) with an UV optical kit at an excitation and emission wavelength of 365 nm and 410-460 nm respectively. Background fluorescence was determined using a blank sample from Niskin and HPS samples devoid of any substrate. Standard curves were established with a standard series of 2.5, 10, 50 and 100 nM of MUF and MCA in 0.2 µm filtered sample

water

Preliminary data

In the eastern and western basin of the bathypelagic Mediterranean Sea, samples incubated at in situ pressure exhibited slightly lower prokaryotic production rates than the decompressed counterparts. Compressed samples from the mesopelagic were lower in the eastern basin and higher in the western basin when compared to decompressed incubations (Fig. 1).

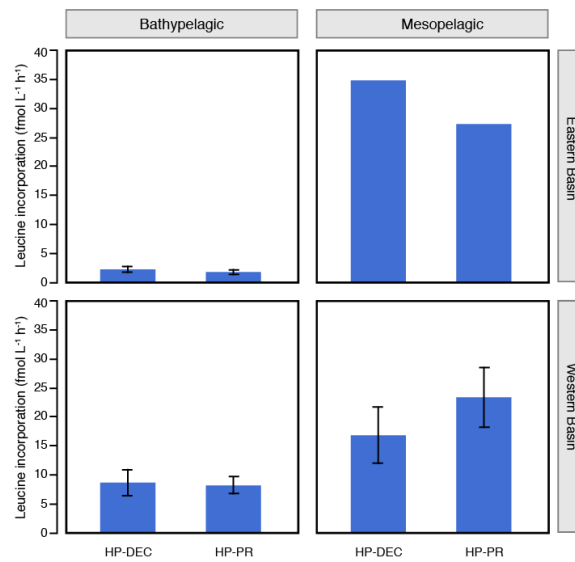


Figure 1. Mean and standard deviation of prokaryotic heterotrophic production in the bathypelagic and mesopelagic of the eastern and western basin of the Mediterranean Sea. HP-DEC indicates pressure samples that were slowly decompressed on board. HP-PR indicates pressure samples that were incubated at the in situ pressure.

References

- Baltar, F., Arístegui, J., Gasol, J.M., Sintes, E., 2009a. Evidence of prokaryotic metabolism on suspended particulate organic matter in the dark waters of the subtropical Atlantic. *Limnology and Oceanography* 54 (1), 182-193.
- Barber, R.T., 1986. Dissolved organic carbon from deep waters resists microbial oxidation. *Nature* 220, 274-275.
- Herndl, G.J., Reinthaler, T., Teira, E., van Aken, H., Veth, C., et al., 2005b. Contribution of Archaea to total prokaryotic production in the deep Atlantic Ocean. *Applied and Environmental Microbiology* 71 (5), 2303-2309.
- Intergovernmental Panel on Climate Change, 2001. *Climate Change 2001: Synthesis Report; Summary for Policymakers*. p. 34.
- Jannasch, H.W., Wirsen, C.O., 1973. Deep-Sea Microorganisms: in-Situ Response to Nutrient Enrichment. *Science* 180 (4086), 641-643.
- Kirchman, D.L., Elifantz, H., Dittel, A.I., Malmstrom, R., 2007. Standing stocks and

activity of Archaea and Bacteria in the western Arctic Ocean. *Limnol Oceanogr.*

Reinthal, T., van Aken, H., Veth, C., Aristegui, J., Robinson, C., et al., 2006.

Prokaryotic respiration and production in the meso- and bathypelagic realm of the eastern and western North Atlantic basin. *Limnology and Oceanography* 51 (3), 1262-1273.

Varela, M.M., van Aken, H.M., Herndl, G.J., 2008. Abundance and activity of Chloroflexi-type SAR202 bacterioplankton in the meso- and bathypelagic waters of the (sub)tropical Atlantic. *Environmental Microbiology* 10 (7), 1903-1911.

Table 1. Sampled stations and depth where prokaryotic heterotrophic production and enzyme activity measurements were performed.

Station	Depth (m)	Prokaryotic Production	Enzyme activity
1	2000	Regular [†]	-
2	2000	Regular	MUF-P; MCA-L
3	2000	Regular	-
4	2000	Regular	MUF-P
5	2000	Regular	MCA-L
6	2000	Experiment [‡]	MUF-P; MCA-L
7	600; 2000	Experiment	MUF-P
9	200; 2000	Experiment	MUF-P; MCA-L
10	250	Experiment	-
11	500	Experiment	MCA-L
12	200; 3000	Experiment; Regular	MUF-P
13	500	Experiment	-
15	650; 2000	Regular	MCA-L
16	1000	Regular	
17	2000	Experiment; Regular	MUF-P
18	2500	Regular	MCA-L
19	2885	Experiment	MUF-P
20	2861	Regular	MCA-L
21	2787	Regular	-
22	2700	Regular	-
23	1300	Regular	-
25	1447	Regular	-
26	3000	Regular	MUF-P; MCA-L
27	3800	Regular	MUF-P; MCA-L
28	1000; 3000	Regular	MUF-P; MCA-L

†Indicates regular HPS sampling consisting of pressurized, decompressed and blank treatments. Samples from a Niskin bottle were used to compare conventional sampling with the HPS sampling technique.

*Indicates special experiments with various treatments

Grupo del Institut de Ciències del Mar-CSIC, Barcelona

A.- Participantes

- Dr. Josep M Gasol, Dept Biologia Marina, ICM
- Dra. Celia Marrasé, Dept Biologia Marina, ICM
- Dr. Mikhail Emilianov, Dept de Física y Oceanografía, ICM
- Dra. Laura Gómez-Consarnau, Dept Biologia Marina, ICM
- Pau Cortés, Dept Biologia Marina, ICM
- Marina Zamanillo, Dept Biologia Marina, ICM

Todos los participantes del ICM se embarcaron en Heraklion. El Dr. Emelianov trabajaba en dos aspectos, el procesamiento de datos físicos, y el muestreo de zooplancton. La parte de datos físicos se presenta en informe aparte.

Actividades:

1.- Recolectar biomasa bacteriana para análisis de DNA microbiano. Marina Zamanillo
--

1a.- Recolección de muestras de DNA microbiano para estudios de diversidad

Objetivo principal: Determinar la diversidad bacteriana en las diferentes masas de agua a lo largo del perfil vertical, y a lo largo del gradiente de longitud.

Para ello se recogían muestras de 10-12 L que se filtraban secuencialmente por filtros de 3 μm y 0.2 μm . Estos filtros se analizarán para diversidad de los genes de 16SrRNA y 18rRNA. Se recogieron un total de **188** filtros de cada tipo.

Además, se recogieron filtros de biomasa bacteriana (por 0.2 μm) de los diversos experimentos realizados: Experimentos HM (un total de **76** filtros), y los experimentos DRM (total de **19** filtros). En estos casos la cantidad filtrada era inferior, entre 0.5 y 5 litros.

1b.- Recolección de muestras de DNA microbiano para estudios de metagenómica

Objetivo principal: Determinar la diversidad de genes microbianos en las diferentes masas de agua a lo largo del perfil vertical, y a lo largo del gradiente de longitud. En este caso nos centramos en la superficie, el máximo de clorofila, la LIW, y la masa de agua de fondo (alrededor de 2000 metros). Las estaciones escogidas para estos análisis fueron la St#2, St#9 (Cuenca oriental), #17 y #22 (Cuenca occidental) y #25 (Océano Atlántico).

Para ello se recogían muestras de 24-36 L que se filtraban secuencialmente por filtros de 3 μm y 0.2 μm . Estos filtros se analizarán para diversidad de todos los genes mediante secuenciación metagenómica. Se recogieron un total de **24** filtros de cada tipo.

2.- Recolección de muestra para Retinal/Proteorodopsina; Vitaminas y Bacterioclorofila a. Penetración de la luz.- Laura Gómez-Consarnau

2a.- Cuantificación de retinal y bacterioclorofila en agua de mar

Objetivo principal: cuantificación de retinal en agua de mar como proxy para cuantificar proteorodopsinas. Las proteorodopsinas son fotosistemas que, según datos genómicos, son muy abundantes en las comunidades bacterianas marinas. Estos fotosistemas captan luz solar de longitud de onda verde y azul principalmente y utilizan los fotones para transformarlos en energía. Además del retinal, existen otros tipos de fotosistemas llamados bacterioclorofilas, menos abundantes, pero que también permiten la fotoheterotrofia en algunas bacterias marinas. Durante esta campaña hemos muestreado agua de mar principalmente en la zona fótica, con la intención de tener una máxima resolución de las concentraciones de proteorodopsina y bacterioclorofila a diferentes longitudes de onda e intensidades de luz. Concretamente, obtuvimos agua de mar a través de botellas Niskin de las profundidades deseadas (3 m, 25 m, 50 m, DCM, 80 m y 200 m). Una vez recogida agua, entre 8 y 12 litros de cada muestra se pre-filtró utilizando mallas de 200 μm y 20 μm para finalmente filtrarla mediante bombas peristálticas, dispuestas de un filtro de policarbonato de 3 μm de tamaño de poro y 47 mm de diámetro (Millipore) seguido de otro filtro de membrana en cartucho de 0.2 μm de tamaño de poro (Sterivex). Una vez terminada la filtración, se midieron los volúmenes exactos que pasaron por los filtros y se desalaron pasando 50 ml de agua MilliQ a través de ellos. Los filtros de 3 μm y 0.2 μm se guardaron a -80°C para su posterior análisis en el laboratorio mediante HPLC y espectrometría de masas. Durante esta campaña se han colectado un total de **180** muestras para el análisis de retinal y bacterioclorofila.

2b.- Cuantificación de células con bacterioclorofila mediante técnicas de microscopía

Además de tomar muestras para la cuantificación analítica de retinal y bacterioclorofila (descritas arriba) existen técnicas que nos permiten determinar el número de células que contienen bacterioclorofila mediante su recuento en el microscopio. Aunque éste no es un valor absoluto, nos indica el porcentaje que células de que tienen la capacidad de utilizar luz mediante estos fotosistemas en cada una de las muestras. Con el objetivo de comparar esos porcentajes con los valores absolutos de bacterioclorofila, tomamos muestras de microscopía de 3 profundidades (3 m, 50 m, DCM). Concretamente, obtuvimos agua de mar a través de botellas Niskin de las profundidades deseadas (3 m, 50 m, DCM). Una vez recogida agua, 10ml de cada muestra se fijó utilizando 1 ml de glutaraldehído (10%). Entre 1 y 48 horas después, las muestras se filtraron utilizando

filtros de membrana de 0.8 μm y 25 mm de diámetro (como soporte) y de policarbonato negros 0.2 μm y 25 mm de diámetro en una rampa de filtración de vacío. Una vez filtrada la muestra, los filtros se guardaron secos en tubos eppendorf de 2 ml a -20°C hasta su posterior análisis en el laboratorio.

2c.- Cuantificación de vitaminas en agua de mar

Objetivo principal: cuantificación de vitaminas B1, B2, B6, B7 y B12 en agua de mar, tanto de la fase disuelta ($<0.2 \mu\text{m}$) como de la particulada ($<20 \mu\text{m}$ y $>0.2 \mu\text{m}$). Las vitaminas son cofactores orgánicos imprescindibles para el metabolismo principal y secundario de todos los organismos vivos. A pesar de su función esencial, se sabe que la mayoría de organismos es deficitario en la síntesis de uno o más de estos cofactores, lo que les hace dependientes otros organismos que las sinteticen y la liberen al medio. La presencia de vitaminas, por tanto, nos indica niveles de interacción entre microorganismos así como la posible limitación metabólica de estos sustratos en el mar. En esta campaña se han tomado muestras de agua de mar distribuidas a través de toda la columna de agua, incluyendo la superficie, DCM, 50 m, LIW, 500, 1000 m y 2000 m.

Concretamente, obtuvimos agua de mar a través de botellas Niskin de la profundidad deseada. Una vez recogida agua, entre 2 y 3 litros de esas profundidades, cada muestra se pre-filtró utilizando mallas de 200 μm y 20 μm para finalmente filtrarla mediante bombas peristálticas, dispuestas de un filtro de membrana 0.2 μm (PALL). Una vez terminada la filtración, congeló 1 litro de agua filtrada para el análisis de vitaminas en la fracción disuelta ($<0.2 \mu\text{m}$) y se midieron los volúmenes exactos que pasaron por los filtros y se desalaron pasando 50 ml de agua MilliQ a través de ellos. Los filtros 0.2 μm se guardaron a -80°C para su posterior análisis en el laboratorio. Durante esta campaña se han colectado un total de **120** muestras para el análisis de vitaminas disueltas y particuladas.

2d.- Muestreos nocturnos

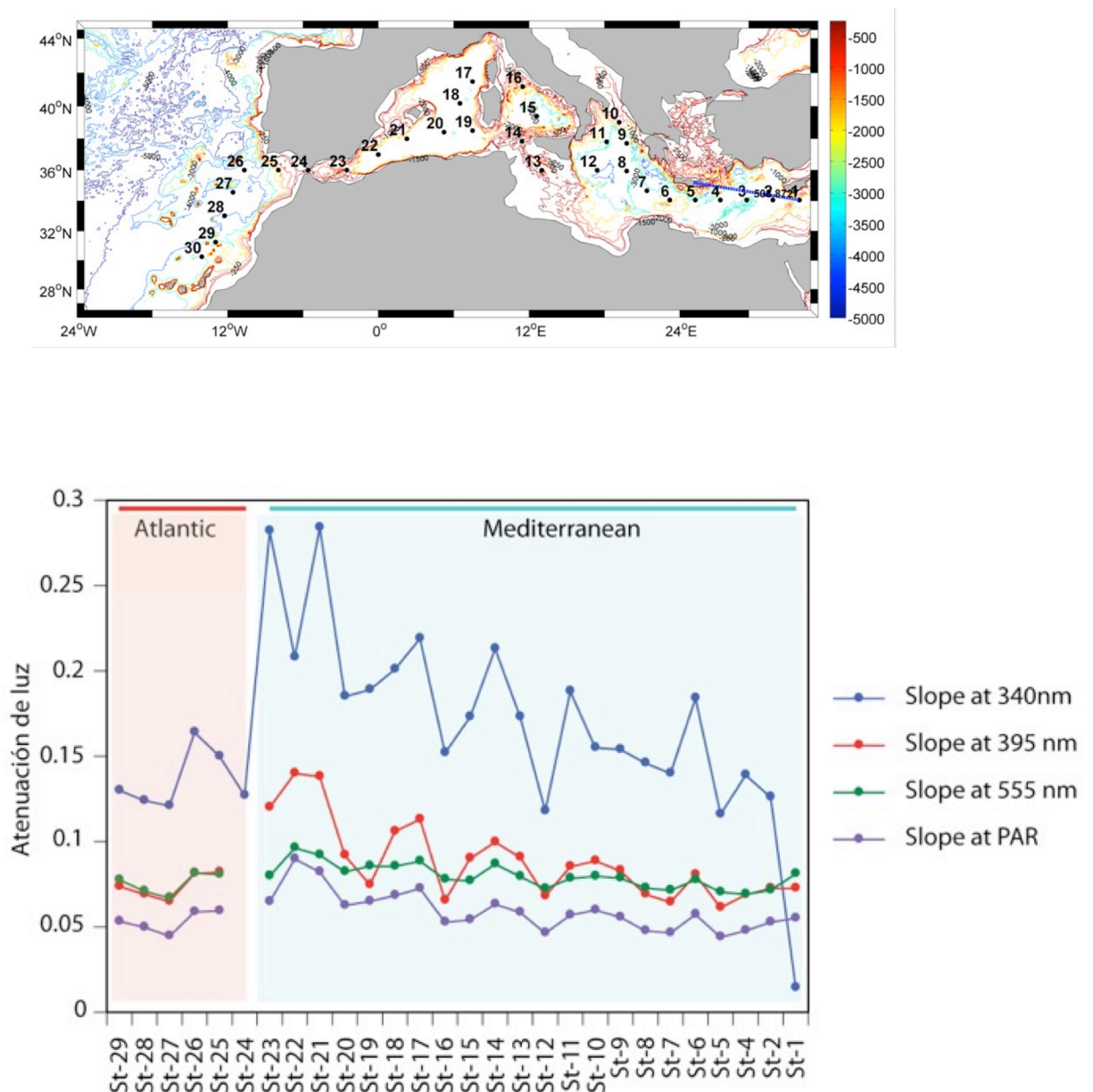
Además de los 29 muestreos efectuados durante esta campaña, se realizaron 3 muestreos nocturnos en las estaciones #11, #20 y #27 que después podrán ser comparados con las esas mismas estaciones del día consecutivo. En estos muestreos se colectaron muestras para los siguientes parámetros: nutrientes, citometría de flujo, producción bacteriana, compuestos volátiles, retinal, bacterioclorofila, vitaminas, DNA y microscopia.

Consideramos estos muestreos nocturnos de especial interés en el estudio de retinal y bacterioclorofila, ya que utilizan la luz y es posible que presenten ciclos diurnos en sus concentraciones. Además de retinal y bacterioclorofila, las vitaminas también parecen comportarse de forma cíclica en periodos de luz-oscuridad, posiblemente a causa de la presencia de organismos fotosintéticos, los cuales tienen metabolismos altamente afectados por la luz solar.

2e.- Penetración de la luz

Se utilizó el radiómetro perfilador PUV 500/510 perteneciente a la UTM para medir el coeficiente de extinción de distintas longitudes de onda en el ultravioleta así como en la PAR (radiación fotosintética activa). Se consiguió medir en todas las estaciones excepto en el estrecho de Gibraltar por la deriva del agua causada por la corriente que ponía en peligro al aparato.

Un análisis preliminar de los datos (Fig 2.e.1) ilustra el cambio en la transparencia del agua para todas las longitudes de onda pero especialmente para el UV al pasar de la zona Este a la Oeste del Mediterráneo y al cambiar al Atlántico. Estos datos se usarán para correlacionar con la presencia de color (cDOM, etc) en el agua, y para determinar las profundidades de extinción de cada longitud de onda y comparar con la presencia de pigmentos algales y bacterianos.



3.- Análisis de compuestos orgánicos volátiles (VOCs) – Pau Cortés

Determinación de la concentración de VOCs en agua de mar

Durante la campaña se ha determinado la concentración de COS, CS₂, dimetilsulfuro (DMS), Isopreno, CH₃I, CH₂Cl₂, CH₂Br₂, CHBr₃, CH₂ClI y CH₂I₂ mediante un sistema de purga y trampa unido a cromatografía de gases y espectrometría de masas. Se recogieron muestras de agua superficial en todas las estaciones y en 7 ocasiones para realizar perfiles verticales en la zona fótica (un total de 100 muestras) en botellas de vidrio de 500 ml. con tapón de vidrio esmerilado, previo filtrado con una malla de 200 µm de poro (Fig.1). En tres de las siete ocasiones en las que realizaron perfiles, se llevaron a cabo perfiles nocturnos a la llegada a la estación para comparar las concentraciones día/noche (Fig.1).

Para el análisis, alícuotas de 25 ml. se obtuvieron de las muestras con jeringas de vidrio con conexión luer-lock de acero inoxidable. El agua fue filtrada manualmente con filtros de fibra de vidrio GF/F Whatman de 0.7 µm de poro y 25 mm. de diámetro dentro de portafiltros con unión luer-lock, antes de ser introducida en el sistema. El calibrado del equipo se ha llevado a cabo mediante el inyectado de distintos volúmenes de patrón gaseoso de los compuestos, obtenidos de sendos tubos de permeación de tasa de permeación conocida.

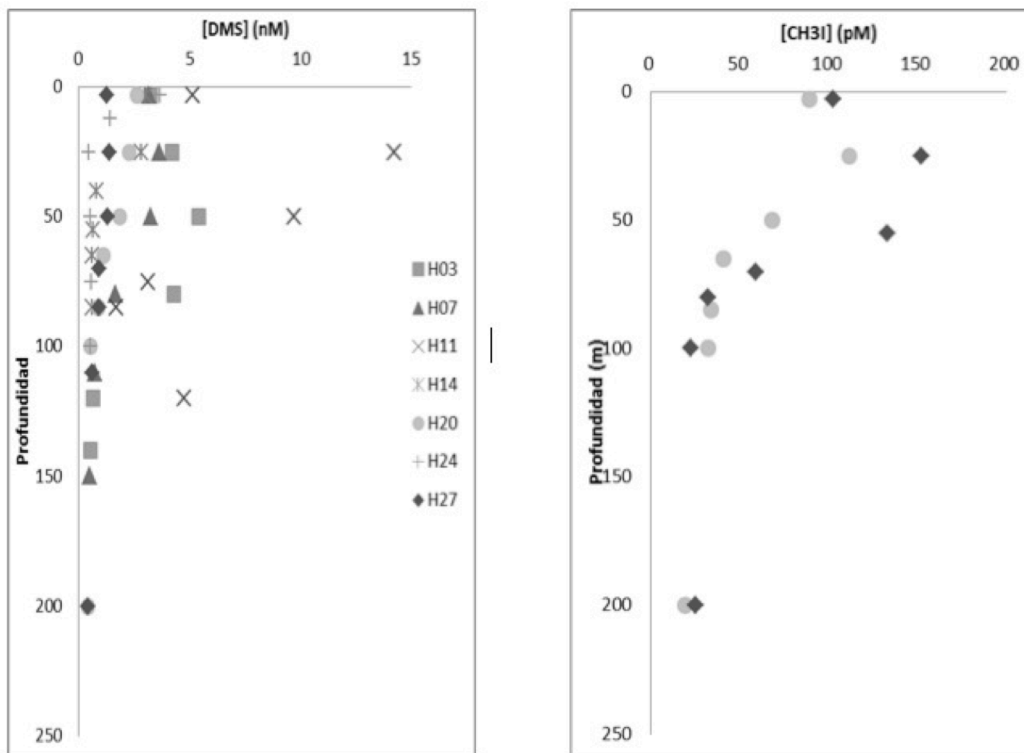


Figura 1: Izquierda: perfiles de concentraciones DMS (nanomoles L⁻¹) realizados durante la campaña. En la leyenda: H (HotMix) y número de estación correspondiente. Derecha: ejemplo de perfil diurno/nocturno de CH₃I correspondiente a la estación 20. Círculos grises corresponden al perfil diurno.

Caracterización de la producción fotoquímica y fotobiológica de VOCs

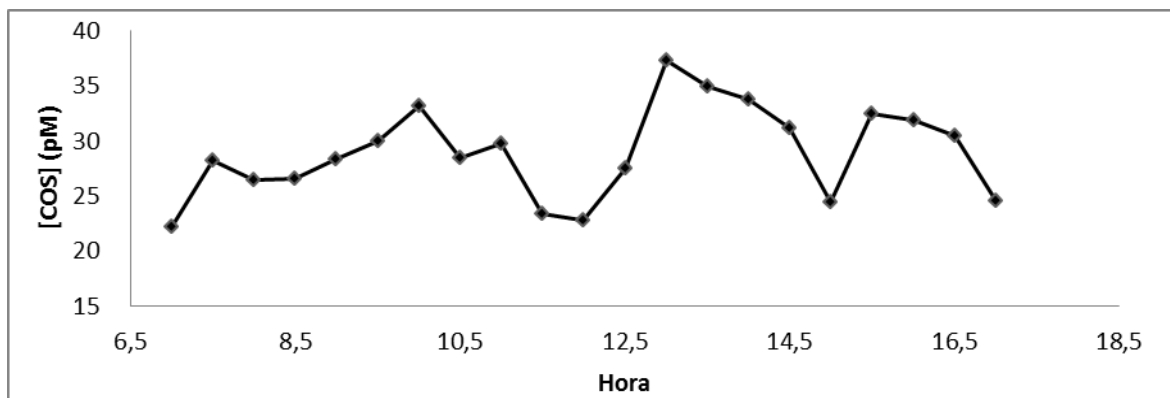
Un total de 5 experimentos, uno por cuenca estudiada en el Mediterráneo, se realizaron para la determinación de tasas de producción de VOCs fotoquímica y fotobiológicamente. Viendo los resultados preliminares del primer experimento se decidió fragmentar las incubaciones para la fotobiología para intentar determinar que tamaños de organismos producían los compuestos. De esta forma, se incubaron matraces de cuarzo con agua sin filtrar para la fotobiología completa; agua filtrada por 0.7 μm (filtros de fibra de vidrio de 47 mm Whatman calcinados) para la fotobiología de pequeño tamaño (bacterias principalmente); y agua filtrada por 0.2 μm (filtros de PES super©-200 de 47 mm PALL) para la fotoquímica. El agua se recogió del sistema de continuo del barco en botellas de 1l. de vidrio con tapón esmerilado de color ámbar y se filtró con un sistema de vidrio con presión positiva de nitrógeno. Las muestras de fotobiología completa se filtraron tal como se explica anteriormente antes de inyectarlas en el sistema, mientras que las otras se introdujeron directamente (80 muestras en total aprox.).

Las incubaciones se llevaron a cabo en un baño en la cubierta del barco con flujo de agua continuo. Las muestras se envolvieron en una o más capas de malla neutra dependiendo de la radiación mediana en la capa de mezcla de la columna de agua.

Para la determinación de la dosis de luz durante la incubación se analizarán los datos del radiómetro de la estación meteorológica del barco y los del radiómetro que se ha estado sumergiendo en las estaciones de la campaña.

Estudio de los cambios diurnos de las concentraciones superficiales

Se estudiaron las variaciones diurnas de las concentraciones de VOCs en la capa superficial en 4 estaciones. En estas ocasiones, muestras del continuo del barco fueron recogidas en botellas de 500 ml. de vidrio con tapón esmerilado y analizadas cada media hora durante 10 horas o más (dependiendo de la duración de la estancia del barco en la estación en cuestión) empezando a las 6:30, hora del barco (Fig. 2). La toma de muestras e inyección en el equipo se realizó tal y como se explica anteriormente (aprox.



100 muestras en total).

Figura 2: Ejemplo de perfil diario realizado en la estación 2. Variaciones en la concentración de COS (picomoles L⁻¹) a lo largo del día en el agua superficial.

Análisis de DMSPt en agua de mar

Muestras de DMSPt (dimetilsulfonio propionato) fueron preparadas para su posterior análisis en el Insitut de Ciències del Mar de Bcelona. Para ello, alícuotas de 20-40ml de agua no filtrada de cada una de las muestras analizadas se guardaron en viales de vidrio sellados después de añadir dos pellets de NaOH (45 g. cada uno, concentración final de 0.2 mol L⁻¹, pH>12).

4.- Microbioma del Zooplancton y análisis filogenéticos del zooplankton

El objetivo de esta actividad era recoger muestras de zooplancton con una red WP2, y malla de 200 µm para el posterior análisis molecular del microbioma bacteriano asociado a las especies de zooplancton. Se trata de comprobar hasta qué punto el microbioma tiene que ver con lo que sucede fuera del organismo, o si el microbioma está determinado para cada organismo.

Se tomaron 29 muestras durante el día, más tres muestras tomadas durante la oscuridad en las mismas estaciones muestreadas al día siguiente. Total **32** muestras.

Además, y dado que había mucho material de cada muestra, vamos a intentar un análisis global de la diversidad de zooplancton en las muestras con aproximaciones metagenéticas.

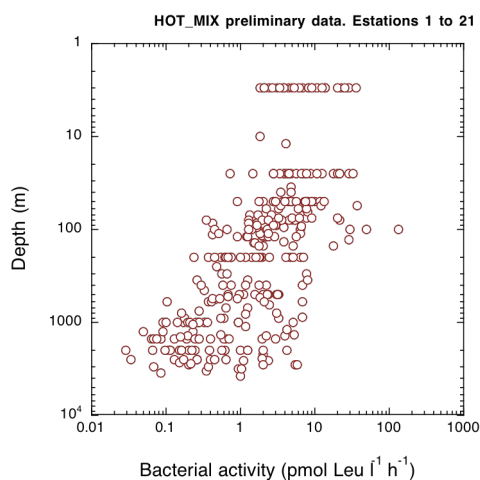
5.- Abundancia de Virus

Para la posterior determinación de la abundancia de virus por citometría de flujo, se tomaron un total de **325** muestras. Estas muestras se fijaron con glutaraldehído al 1% y se congelaron. Se analizarán en el laboratorio.

6.- Actividad bacteriana

Se analizó la actividad bacteriana a lo largo del transecto del Mediterráneo mediante la estima de la incorporación de leucina tritiada. Se utilizó una concentración de 20 nM, y se muestrearon un total de 29 estaciones, con unas 11 profundidades por estación en promedio (total de muestras, 335). Hasta un total de 794 muestras, se midió la actividad bacteriana en los experimentos de limitación por nutrientes de la degradación de carbono (véase punto 10, a continuación), en los de concentración y degradación de materia orgánica del océano profundo (grupo IIM), de manipulación de virus (grupo UGr) y algunos otros experimentos sobrevenidos.

La Figura 9.1 muestra un perfil vertical combinado de las estaciones, donde se muestra el declive logarítmico con la profundidad, pero también una gran variabilidad entre estaciones en cada profundidad, con rangos que cubren más de dos órdenes de magnitud entre estaciones.



Finalmente, y en las estaciones nums. 2, 9 (cuenca oriental), 22 (cuenca occidental) y 26 (Atlántico) se realizaron experimentos de microautoradiografía combinados con FISH en las partículas (filtros de 0.8 μm y en la vida libre (filtros de 0.2 μm). En los cuatro casos los experimentos se hicieron con agua de superficie, del DCM, de la LIW, y del agua profunda (ca. 2000 m). Las muestras han vuelto al lab de Barcelona donde serán analizadas próximamente.

7.- Experiments determining the role of organic and inorganic nutrients on deep ocean prokaryote activity, biogeochemical role and diversity - Cèlia Marrasé

During the Hotmix cruise we conducted 3 experiments (D1, D2, D3) to examine the effect of inorganic and organic nutrients on bacterial activity.

Experiment D1 - was performed to test 1) the importance of organic matter quality on prokaryotic heterotrophic activity and 2) the effect of B-vitamins on prokaryote organic matter utilization.

Water from 2000 m depth at station 5 (2014/05/03) was collected and filtered through 0.6- μm pore-size polycarbonate filter. The filtered water was kept at dark 13°C experimental chamber overnight until additions were performed. The water was distributed in six 20 L fluorinated polietililene carboys. One of them was used to sample for DNA and TEP analyses. the rest were used for experimental treatments as follows: K, was kept as control, CL received an addition of Labile Compounds (Acetate and glucose), CR received an addition of Recalcitrant Compounds (mixture of humic acids), CRH received the same mixture of humic compounds but at higher (threefold) concentration than CR and CRV received the same humic acid concentration of CR and a mixture of B vitamins (B1, B7 and B12) . The C amendments were calculated to attain 30 μM final concentration in each of the enriched experimental conditions, except for CRH where the final concentration was calculated to reach 90 μM . After the additions, the containers were kept for six hours at 13°C before sampling in order to assure homogenization. Water from each of the experimental conditions was distributed among 12 acid cleaned glass bottles of 250 mL and 3 of 500 mL. Three glass bottles for each condition were sampled at day 0, 2, 5 and 11 of the experiment for bacteria abundance, bacterial production, FDOM, DOC and nutrients. In addition, a bottle of each condition was sampled every day to monitor bacteria abundance.

At day 7, we added nutrients (13 μM N and 0.6 μM P final concentration) in one of the three 500 mL bottles in each experimental condition except for the CRV and we named them as KN, CLN, CRN and CRHN. Samples for TEP and DNA were taken at 0, 7 and 11 day of the experiment.

Preliminary results are shown in Figure 1.

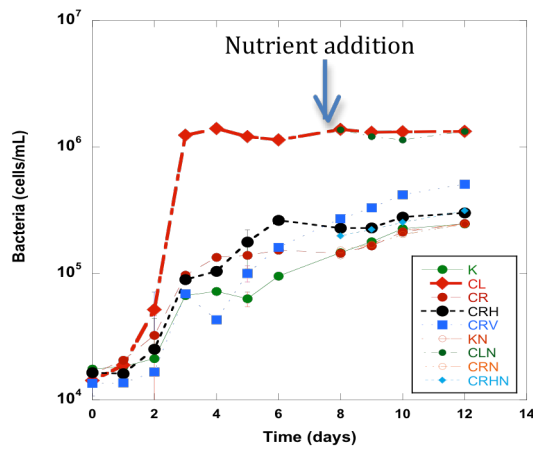


Fig. 1.-
Temporal
changes of
prokaryote
abundance in
the different
treatments of
Experiment D1

Experiment D2 was designed to test the effect of inorganic nutrients on the activity of deep-water prokaryote assemblages.

At station 12 (2014/05/10), water from three different depths (2000, 1500 and 1000 m) were collected and filtered through 0.6 μm pore-size polycarbonate filter. 1 L filtered water from each depth was distributed into four $\frac{1}{4}$ L acid cleaned glass bottles. Two bottles were kept as a control and two were amended with inorganic nutrients (13 μM N and 0.6 μM P final concentration). Samples for DOC, Inorganic nutrients, FDOM and bacteria abundances were taken at initial (T:0) and final time (T: 14). In addition, a bottle of each condition was sampled every day to monitor bacteria abundance. Preliminary results are shown in Figure 2.

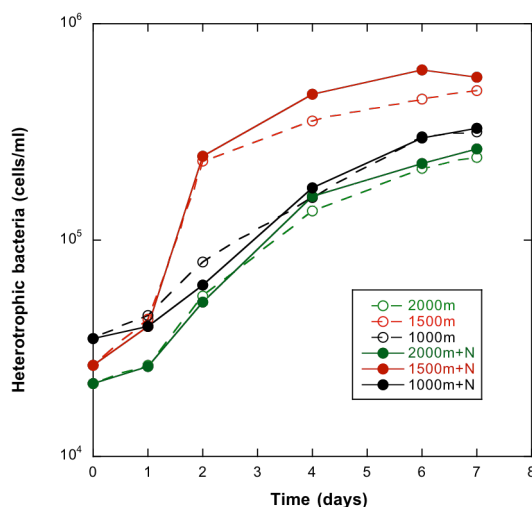


Fig 2.- Temporal
changes of prokaryote
abundance in the
different treatments of
Experiment D2

Experiment D3 was performed to test whether or not a synergetic effect of inorganic and organic nutrients on prokaryote activity exists.

Water from 2000 m depth at station 22 (2014/05/20) was collected and filtered through 0.6 μm pore-size polycarbonate filter. The filtered water was kept at dark 13°C experimental chamber overnight until additions were performed. The water was distributed in eight 1 L fluorinated polyethylene containers which received different carbon additions: two of them (K) were kept as control, two (CL containers) received an addition of Labile Compounds (Acetate and glucose), two (CR) received an addition of Recalcitrant Compounds (mixture of humic acids), and other two CRH received the same mixture of humic compounds but at higher (threefold) concentration than CR. The C amendments were calculated to attain 30 μM final concentration in each of the enriched experimental conditions, except for CRH where the final concentration was calculated to reach 90 μM .

One container of each of carbon addition treatment received nutrients (12 μM of NH_4Cl and 0.6 μM of KH_2PO_4 final concentration), the bottles with inorganic nutrient enrichments were labelled with an “N” After the additions, the containers were kept for three hours at 13°C before sampling in order to assure homogenization. At present we are analysing the biological and chemical variables.

Anexo: Actividades de disseminación durante la campaña

Durante la campaña se publicó diariamente un blog (<http://hotmix-sarmiento2014.blogspot.com.es/>). En él se trataba de compartir la experiencia de estudiantes embarcados, pero también de disseminar la razón científica de los análisis que efectuábamos. Se combinaron, por tanto, desde comentarios con base científica sobre, p.ej. masa de agua del mediterráneo, con imágenes de los animales que íbamos encontrando, con entradas más ligeras sobre las sensaciones de las personas embarcadas.

En total, **45** entradas, de las cuales 8 durante el tránsito de ida a Heraklion. Estas entradas tuvieron un total (a 30 de Mayo de 2014) de 9497 hits, con >250 visualizaciones de página de media al día. La inmensa mayoría de visitantes lo hicieron desde España, aunque tuvimos entre 100 y 300 visitas de Reino Unido y EUA.

La siguiente gráfica muestra la evolución de visitas durante la campaña

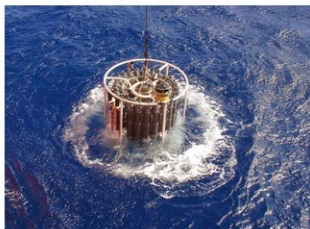


Y la imagen siguiente es una captura de pantalla del último post:

El blog de la campaña HotMix-2014

JUEVES, 29 DE MAYO DE 2014

Fin de viaje - La "Piedra Rosetta"



Nuestro viaje a lo largo de la senda del Agua Levantina ("Levantine Intermediate Water"-LIW) ha llegado a su fin. Hace pocos días cruzamos el Estrecho de Gibraltar, y con nosotros la LIW salió resbalando sobre el talud costero hacia el Atlántico, buscando mayores profundidades acordes con su salinidad y temperatura. En este proceso de expansión y mezcla, la LIW cambia de nombre (primero "Overflow Mediterranean Water", ahora "Mediterranean Water") y forma grandes meandros y remolinos, caracterizando a las aguas profundas de una heterogeneidad que dista mucho de la idea clásica de un océano oscuro, homogéneo y uniforme.

Nos sentimos cansados, pero satisfechos. Llevamos más de un mes de trabajo intenso recogiendo miles de muestras y decenas de miles de datos oceanográficos, que nos llevaremos a casa para analizar los próximos meses. Hemos recorrido 100 años de vida de la LIW en poco más de un mes. Nuestra intención es descifrar algunos de los secretos ocultos que esta masa de agua lleva de equipaje en su viaje hacia el Atlántico, utilizando como herramienta principal la "Roseta Oceanográfica"; nuestra "Piedra Rosetta", llave y puerta de nuevos campos de conocimiento en el océano.



Nuestra "Piedra rosetta" saliendo del agua con la información recogida del fondo del océano.



La "Piedra Rosetta" (fragmento de una antigua estela)

SOBRE ESTE BLOG

En esta campaña oceanográfica participamos gente de muchas instituciones y de muchos países. Nuestra intención es mostrar y explicar por qué la hacemos, qué es lo que queremos conocer del Mar Mediterráneo, por qué tiene interés, y cómo es la vida y el trabajo en un buque oceanográfico.

Si os interesa el mar, la ciencia, la biología, la química, la física, la oceanografía, o simplemente la aventura de viajar y trabajar en un barco, esperamos que el blog os guste y aprendáis el máximo de cosas sobre la oceanografía, la biogeoquímica y la microbiología del mar en general y del Mediterráneo en particular.

CATEGORÍAS / ETIQUETAS

Pep Gasol (9)
Javier Aristegui (7)
transecto (6)
alumnos (5)
Chie (3)
Henar (3)
Javier (3)
Mine (3)

Y en anexo el listado de las entradas al blog:

29/5/14	Fin de viaje - La "Piedra Rosetta"
29/5/14	Chachos, chachas
28/5/14	Desmontando pirámides
27/5/14	La vida pirata
26/5/14	Puente.....Cubierta, Cubierta.....Puente!
25/5/14	Filtrando en sueños...
23/5/14	Nutrientes y atunes
22/5/14	Baños de sol
21/5/14	El olor del mar
20/5/14	Tengo mi corazón partido
19/5/14	Al-Andalus marino
18/5/14	Luna, luna, luna
17/5/14	Bajo presión
16/5/14	Una ensalada de Rosetas!!
15/5/14	Las bocas de Bonifacio
14/5/14	Trece y martes...
14/5/14	Delfines! Tortugas! Medusas!
13/5/14	Cuestión de concentración....

11/5/14	3 verde DOA, 5 rojo Nau, 7 amarillo en el laboratorio...
9/5/14	La plaza Mayor del Sarmiento
8/5/14	Mezclando...
7/5/14	Compañeros de rutina y de inolvidables momentos
7/5/14	El dragón malo del Mediterráneo (cuento)
6/5/14	Soy Mineroooooo.....
6/5/14	Retratos sobre el mar
5/5/14	HotMix: Una campaña distinta
4/5/14	Cómo nos cuidan!
3/5/14	Autopistas en el océano
2/5/14	Nuestro físico
2/5/14	<u>El barco turco...</u>
30/4/14	Y a todo esto, ¿Para qué vinimos?
29/4/14	El Sudoku
28/4/14	De nuevo en un buque...
27/4/14	<u>De nuevo en la mar</u>
24/4/14	I quan creieu que arribeu, sapigueu trobar noves sendes
24/4/14	<u>Tierra a la vista</u>
23/4/14	Todo iba viento en popa, hasta que éste nos alcanzo...
23/4/14	<u>Cruceros de Oportunidad</u>
22/4/14	Con diez cañones por banda...
21/4/14	Entre Matlab y Sigma Plot
20/4/14	Día 3 del tránsito
20/4/14	Primera experiencia oceanográfica
16/4/14	<u>Zarpa el Sarmiento</u>
15/4/14	<u>Nota de prensa</u>
15/4/14	<u>Preparando la salida</u>

INFORME DEL TRABAJO REALIZADO EN EL LABORATORIO DE RADIOACTIVIDAD DEL B/O SARMIENTO DE GAMBOA DURANTE LA CAMPAÑA *HOTMIX*

(27 de Abril - 31 de Mayo de 2014)

Jefe de campaña:

Dr. Javier Arístegui (UPLGC)

Supervisor de la instalación durante la campaña:

Dr. Celia Marrasé (ICM-CSIC)

Operadores:

Dr. Josep M Gasol (ICM-CSIC),

Dr. Thomas Reinthaler (University of Viena)

Radionúclido empleado:

- **Tritio (^3H)**
 - Radionúclido: Tritio
 - Tipo de emisión: Beta
 - Energía de emisión: 0.01859 MeV
 - Semiperíodo: 4500 días
 - Actividad total embarcada: 23 mCi
 - Cantidad usada: 18.6 mCi
 - Actividad específica: 112 Ci/mmol ($= 4.14 \cdot 10^9$ Bq/mmol)
 - Forma química: Leucina (peso molecular 141 g/mol)
 - Mejor solvente: agua

Otros reactivos que se manipularon en el laboratorio radiactivo:

Ácido tricloracético, formaldehído y cóctel de centelleo.

Descripción de las operaciones realizadas

Determinación de las tasas de producción bacteriana – Protocolo A

La producción bacteriana se estimó mediante la adición de $0.54 \mu\text{Ci}$ ($2 \cdot 10^4$ Bq) de ^3H -leucina a muestras de agua (1.2 ml) de 10-14 profundidades en cada estación. De la misma manera se inocularon también las muestras correspondientes a diversos experimentos. Para cada muestra se prepararon 4 réplicas + 2 controles muertos fijados con TCA (en tubos eppendorf). Los eppendorfs se incubaron durante 5-24 h en bolsas opacas en incubadores de temperatura controlada. Las incubaciones se detuvieron mediante la adición de ácido tricloracético (TCA) al 5%. Posteriormente se centrifugaron y se eliminó el sobrenadante por aspiración. Se añadió a cada uno de los viales eppendorf 0.5 ml de cóctel de centelleo. Los eppendorfs se depositaron dentro de viales de centelleo de 20 ml para su contaje en el contador de centelleo del barco. Todas las muestras se han retornado a la instalación radioactiva del ICM (IR 1799).

Determinación de las tasas de producción bacteriana – Protocolo B

La producción heterotrófica de las bacterias se midió in situ. 25 μL de una solución 10 μM de leucina tritiada (actividad específica 108 Ci mmol⁻¹) se colocarán en la superficie de los pistones de 10 HPS (High pressure sampler: un aparato que se integraba en la roseta del CTD, sustituyendo una botella). La concentración final siendo de 5 nM. En profundidad los HPS se cerraran con agua, y se incubaran en el laboratorio radioactivo durante 24 horas. La muestra se recoge en un tubo que se fija con formol (1.7% final conc). Las muestras se filtran por 0.2 μm (Whatman Nuclepore, 25 mm filter diameter) con filtros de acetato de celulosa por debajo (Millipore, HAWP, 0.45- μm pore size). Las muestras se extraen con TCA 5%, se limpian con agua pura, se secan y se les añadía cóctail de centelleo. Una vez contadas las muestras se retornan al laboratorio de Viena.

Balance de operaciones (véase libro de operaciones en adjunto 1)

Se utilizaron unos 18 mCi de los 23 mCi embarcados. Los 5 mCi restantes retornan a la instalación del ICM.

Unos 44 μCi retornan en forma de muestras en líquido de centelleo. La mayor parte al laboratorio del ICM.

Eliminación de residuos

Los residuos se clasificaron de acuerdo a su estado físico (sólido, líquido o mixto). Se procedió de la siguiente manera para la gestión de los residuos:

Residuos líquidos:

El líquido procedente de las filtraciones (medio acuoso) fue evacuado directamente al mar –siempre que nos encontrásemos a más de 12 millas de costa, diluyéndolo convenientemente con agua de mar o del grifo. Las evacuaciones diarias de residuos líquidos se detallan en el diario de campaña. En total se evacuaron unos 16 L de residuos con ³H.

Residuos sólidos (puntas de pipeta, papel, guantes, tapones...):

Se utilizaron bolsas especiales para residuos radiactivos que se almacenaron convenientemente en el laboratorio hasta su traslado a la instalación radiactiva IR 1799. El volumen de residuos sólidos generado fue de ~35 L (aproximadamente 2 L por día).

Residuos mixtos (viales con líquido de centelleo):

Los viales se almacenaron en cajas, envueltos en bolsas especiales para residuos radiactivos. La eliminación final de estos residuos se realizará desde la instalación en tierra. Los residuos de ³H se estima que tienen una actividad de 0.006 μCi (207 Bq) por muestra, en total 42 μCi (16 10^5 Bq) del grupo del ICM, y unos 80 μCi del grupo de UNIVIE. En ningún caso la radiactividad cruza las paredes de los viales o las cajas.

Incidencias de la campaña.

Ninguna de especial relacionada con la radioactividad.

Dos incidencias con el container: Rotura de la manija de la puerta, y problema eléctrico en los fusibles que fue arreglado por el personal de la UTM y el del barco

Comentarios acerca del estado de la instalación

Sería aconsejable la instalación de espacio en la pared para el almacenaje de material y el anclaje de material de laboratorio.

Limpieza

Aparte de las precauciones habituales en todos los procedimientos de trabajo con materiales radioactivos (uso de bandejas, papel secante, etc...), una vez finalizada la campaña se limpiaron a fondo todas las superficies utilizadas del laboratorio con agua, detergente y lejía. Se realizó un control de los niveles de radiactividad al final de la campaña, mediante la realización de frotis con filtros de fibra de vidrio (GF/F) en superficies de 20 x 5 cm representativas de la totalidad del laboratorio.

Los resultados de dichos controles se presentan en la tabla 1:

Vial ID #			DPM	Bq por cm2
11	Frotis 1	Control fuera del contenedor	23	0.00391
1	Frotis 1	Mesa babor	336	0.05712
2	Frotis 1	Mesa Babor	48	0.00816
3	Frotis 1	Campana Captair	94	0.01598
4	Frotis 1	Centrifuga-1	6701	1.13917
5	Frotis 1	Centrifuga 2	301	0.05117
6	Frotis 1	Contador centelleo	44	0.00748
7	Frotis 1	Mango puerta	55	0.00935
8	Frotis 1	Puerta nevera	68	0.01156
9	Frotis 1	Suelo	30	0.0051
10	Frotis 1	Poyata estribor	78	0.01326
12	Frotis 1	Sink 1	635	0.10795
13	Frotis 1	Sink 2	951	0.16167

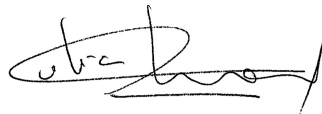
Aunque todos estaban muy debajo de los límites (se recuerda que para zona activa los límites son 37 Bq por cm-2 y para zonas no activas son 3.7 Bq cm-1, decidimos repetir la limpieza del fregadero y de la centrifuga. La limpieza se efectuó con agua y jabón y con etanol.

Vial ID #				DPM	Bq por cm2
20	Frotis-2		Sink 1	42	0.00714
21	Frotis-2		Sink 2	41	0.00697
22	Frotis-2		Mesa Babor	44	0.00748
23	Frotis-2		Centrifuga 1	227	0.03859
24	Frotis-2		Centrifuga 2	56	0.00952

Se considera que el laboratorio está en buen estado de limpieza.

Fecha y Firma 15 de Junio de 2014

Supervisor



Cèlia Marrasé Peña

Jefe de Campaña e Investigador Principal proyecto
HotMix



Javier Aristegui

Anexo 1: Libro de operaciones

ACTIVIDADES DIARIAS CAMPAÑA HOTMIX

Fecha	Cantidad	Determinaciones/Acción	(μci)	(μci)	(μci)
			Actividad	Desecho líquido	Muestra retenida
28/4/2014		Preparación de disoluciones de trabajo	0.00	0.00	0.00
28/4/2014		0 mediciones de inc. leucina - Protocolo B	0	0.00	0.00
28/5/2014		222 mediciones de inc. leucina - Protocolo A	119.88	118.64	1.24
28/5/2014		21 mediciones de inc. leucina - Protocolo B	567	566.88	0.12
29/4/2014		240 mediciones de inc. leucina - Protocolo A	129.60	128.26	1.34
29/4/2014		19 mediciones de inc. leucina - Protocolo B	513	512.89	0.11
30/4/2014		280 mediciones de inc. leucina - Protocolo A	151.20	149.63	1.57
30/4/2014		18 mediciones de inc. leucina - Protocolo B	486	485.90	0.10
1/5/14		250 mediciones de inc. leucina - Protocolo A	135.00	133.60	1.40
1/5/14		19 mediciones de inc. leucina - Protocolo B	513	512.89	0.11
2/5/14		280 mediciones de inc. leucina - Protocolo A	151.20	149.63	1.57
2/5/14		10 mediciones de inc. leucina - Protocolo B	270	269.94	0.06
3/5/14		236 mediciones de inc. leucina - Protocolo A	127.44	126.12	1.32
3/5/14		20 mediciones de inc. leucina - Protocolo B	540	539.89	0.11
4/5/14		270 mediciones de inc. leucina - Protocolo A	145.80	144.29	1.51
4/5/14		21 mediciones de inc. leucina - Protocolo B	567	566.88	0.12
5/5/14		290 mediciones de inc. leucina - Protocolo A	156.60	154.98	1.62
5/5/14		20 mediciones de inc. leucina - Protocolo B	540	539.89	0.11
6/5/14		200 mediciones de inc. leucina - Protocolo A	108.00	106.88	1.12
6/5/14		19 mediciones de inc. leucina - Protocolo B	513	512.89	0.11
7/5/14		224 mediciones de inc. leucina - Protocolo A	120.96	119.71	1.25
7/5/14		22 mediciones de inc. leucina - Protocolo B	594	593.88	0.12
8/5/14		246 mediciones de inc. leucina - Protocolo A	132.84	131.46	1.38
8/5/14		21 mediciones de inc. leucina - Protocolo B	567	566.88	0.12
9/5/14		274 mediciones de inc. leucina - Protocolo A	147.96	146.43	1.53
9/5/14		19 mediciones de inc. leucina - Protocolo B	513	512.89	0.11
10/5/14		286 mediciones de inc. leucina - Protocolo A	154.44	152.84	1.60
10/5/14		18 mediciones de inc. leucina - Protocolo B	486	485.90	0.10
11/5/14		264 mediciones de inc. leucina - Protocolo A	142.56	141.08	1.48
11/5/14		16 mediciones de inc. leucina - Protocolo B	432	431.91	0.09
12/5/14		288 mediciones de inc. leucina - Protocolo A	155.52	153.91	1.61
12/5/14		16 mediciones de inc. leucina - Protocolo B	432	431.91	0.09
13/5/2014		250 mediciones de inc. leucina - Protocolo A	135.00	133.60	1.40
13/5/2014		15 mediciones de inc. leucina - Protocolo B	405	404.92	0.08
14/5/2014		240 mediciones de inc. leucina - Protocolo A	129.60	128.26	1.34
14/5/2014		12 mediciones de inc. leucina - Protocolo B	324	323.93	0.07
15/5/2014		236 mediciones de inc. leucina - Protocolo A	127.44	126.12	1.32
15/5/2014		21 mediciones de inc. leucina - Protocolo B	567	566.88	0.12
16/5/2014		242 mediciones de inc. leucina - Protocolo A	130.68	129.32	1.36
16/5/2014		12 mediciones de inc. leucina - Protocolo B	324	323.93	0.07
17/5/2014		228 mediciones de inc. leucina - Protocolo A	123.12	121.84	1.28
17/5/2014		19 mediciones de inc. leucina - Protocolo B	513	512.89	0.11
18/5/2014		226 mediciones de inc. leucina - Protocolo A	122.04	120.77	1.27
18/5/2014		20 mediciones de inc. leucina - Protocolo B	540	539.89	0.11
19/5/2014		222 mediciones de inc. leucina - Protocolo A	119.88	118.64	1.24
19/5/2014		19 mediciones de inc. leucina - Protocolo B	513	512.89	0.11
20/5/2014		212 mediciones de inc. leucina - Protocolo A	114.48	113.29	1.19
20/5/2014		20 mediciones de inc. leucina - Protocolo B	540	539.89	0.11
21/5/2014		280 mediciones de inc. leucina - Protocolo A	151.20	149.63	1.57
21/5/2014		18 mediciones de inc. leucina - Protocolo B	486	485.90	0.10
22/5/2014		299 mediciones de inc. leucina - Protocolo A	161.46	159.79	1.67
22/5/2014		22 mediciones de inc. leucina - Protocolo B	594	593.88	0.12
24/5/2014		288 mediciones de inc. leucina - Protocolo A	155.52	153.91	1.61
24/5/2014		21 mediciones de inc. leucina - Protocolo B	567	566.88	0.12
25/5/2014		395 mediciones de inc. leucina - Protocolo A	213.30	211.09	2.21
25/5/2014		20 mediciones de inc. leucina - Protocolo B	540	539.89	0.11
26/5/2014		240 mediciones de inc. leucina - Protocolo A	129.60	128.26	1.34
26/5/2014		22 mediciones de inc. leucina - Protocolo B	594	593.88	0.12
27/5/2014		224 mediciones de inc. leucina - Protocolo A	120.96	119.71	1.25
27/5/2014		22 mediciones de inc. leucina - Protocolo B	594	593.88	0.12
TOTAL:	7974		18647.3	18602.6	44.7

Visto Bueno, el Supervisor

Celia Marrasé