

# RED DE OBSERVATORIOS MICROBIANOS

Protocolos de estandarización y toma de muestras de agua en América Latina



**MICROSUDAQUA**

Red Colaborativa en Ecología Acuática Microbiana de América Latina

**Foto Tapa: Dr. Cristian D. Torres**

# **Red de Observatorios Microbianos**

*Protocolos de estandarización y toma de muestras de agua en  
América Latina*

*Fermani Paulina, Gereá Marina, Graziano Martín, Mateus-Barros Erick, Sabio y  
García Carmen, Sánchez María Laura, Schiaffino Romina*

*Compiladores*

*2023*

*Primera Edición*

## **Resumen**

El impacto antrópico y los factores climáticos actúan de manera conjunta sobre los ecosistemas como agentes forzantes de cambios, llevando muchas veces al deterioro de los mismos. El efecto de estos agentes depende de la localización geográfica, el clima y la vegetación, entre otros factores naturales y antrópicos que caracterizan los ambientes estudiados. Para comprender el impacto de estos factores sobre los ecosistemas acuáticos y/o terrestres es importante contar con información continua, estandarizada y extendida en el tiempo.

Dentro de los ecosistemas acuáticos, los ensamblajes microbianos juegan un rol fundamental en los ciclos de la materia y energía; y además tienen la potencialidad de ser indicadores robustos del estado ecológico y sanitario de los mismos, debido a su sensibilidad y rápida respuesta a los cambios ambientales. En este sentido, el monitoreo a largo plazo de los ensamblajes microbianos podría brindar valiosa información sobre las características de los cuerpos de agua y los cambios que éstos sufren.

Teniendo en cuenta estas premisas, en el marco de la primera reunión de la red colaborativa en ecología acuática microbiana de América Latina ( $\mu$ SudAqua), realizada en La Paloma (Rocha, Uruguay) en diciembre de 2017, se decidió crear un conjunto de observatorios cuyo objetivo principal es evaluar de qué manera el impacto antrópico y los factores climáticos, en un gradiente latitudinal, influyen la estructura y dinámica de la comunidad microbiana a nivel continental en la diversidad de ambientes acuáticos de la región. Es así que nace la Red de Observatorios Microbianos de Latinoamérica.

Los observatorios microbianos son herramientas valiosas que se han establecido alrededor del mundo para tener acceso a información sistematizada sobre las comunidades microscópicas. Sin embargo, en América Latina son escasos. En esta Red de Observatorios se seleccionaron sitios-observatorios correspondientes a diferentes ambientes acuáticos (dulces, marinos, lénticos, lóticos, con diferentes tipos de impacto antrópico) teniendo en cuenta la accesibilidad a los mismos para lograr la continuidad de los muestreos. Asimismo, los sitios-observatorios elegidos contemplan una frecuencia mínima bimestral (preferentemente mensual) y simultánea, en la capa superficial de la columna de agua (eufótica), y la medición de parámetros sencillos, utilizando protocolos

consensuados entre sus integrantes, que faciliten la continuidad a largo plazo y la posibilidad de realizar análisis comparativos entre los distintos sitios.

El **presente libro** pretende enumerar los protocolos establecidos y estandarizados para la toma de muestras de parámetros físico-químicos y comunidades biológicas en el agua, y el posterior análisis en el laboratorio, teniendo en cuenta los diferentes cuerpos de agua.

Esta red tiene como objetivo fundamental afianzar los lazos de colaboración entre laboratorios de investigación de diferentes países latinoamericanos para potenciar las capacidades y conocimientos de cada grupo. De esta manera, pretendemos promover el intercambio de saberes para encontrar respuestas colectivas a preguntas que nos conciernen como región.

## ***Prólogo***

***Fermani Paulina, Gereza Marina, Graziano Martín, Sabio y García Carmen, Schiaffino Romina.***

Los observatorios microbianos son un instrumento valioso para obtener información sistematizada y organizada sobre las comunidades microbianas. A pesar de esto, en América Latina se encuentran pocos observatorios que contemplen estudios a largo plazo, debido principalmente a la dificultad de mantener la infraestructura necesaria para este tipo de actividades. En este sentido, durante el primer encuentro de la Red de Ecología Acuática Microbiana ( $\mu$ SudAqua, <https://microsudaqua.netlify.app/>) llevada a cabo en diciembre de 2017 en Rocha (Uruguay), surgió la necesidad de crear una Red de Observatorios Microbianos Acuáticos de América Latina. Allí comenzaron a debatirse y consensuarse los objetivos a largo plazo para la Red. Así, se estableció como objetivo general conformar un conjunto de observatorios (sitios) para evaluar de qué manera el impacto antrópico y los factores climáticos en un gradiente latitudinal afecta la estructura y dinámica de la comunidad microbiana a nivel continental en la diversidad de ambientes acuáticos de la región. Confiábamos también que esto nos permitiría generar un trabajo colectivo entre grupos latinoamericanos para fortalecer los estudios regionales y colaborativos.

Para la conformación inicial de la Red de Observatorios Microbianos Acuáticos de América Latina, en la primera reunión de la Red  $\mu$ SudAqua se propusieron 8 sitios-observatorios de diferentes tipos de ambientes acuáticos (de agua dulce, marinos, lénticos, lóticos) a lo largo de Latinoamérica. Para lograr la continuidad de los muestreos, en la selección de los sitios se consideró fuertemente la accesibilidad a los mismos y que éstos, preferentemente, formaran parte de proyectos locales que ayudaran a sostener la recolección de las muestras. Estos sitios fueron reevaluados en base a las dificultades encontradas durante la fase de consolidación de la Red. Así, los muestreos de los microobservatorios contemplaron una frecuencia mensual (eventualmente bimestral, dependiente de la accesibilidad del lugar), en la capa superficial de la columna de agua (eufótica), y la medición de parámetros sencillos que faciliten la continuidad a largo plazo.

Posteriormente, se realizó un relevamiento de los sitios propuestos y la eventual incorporación de nuevos observatorios.

Para poder abordar un análisis conjunto de los parámetros en cada sitio, en el primer encuentro del año 2017 se debatieron y se definieron las variables comunes a analizar. Una vez definidos estos parámetros, se inició un largo proceso de búsqueda de protocolos para cada uno de ellos que, en lo posible, pudieran ser utilizados por todos los observatorios (ríos, arroyos, lagos, estuarios, etc.). A través de encuestas e intercambios virtuales se relevó el equipamiento, las técnicas y los protocolos utilizados por cada lugar y se buscó consensuar protocolos unificados para cada uno de los parámetros propuestos. Durante el proceso, se evidenció que los ambientes eran muy heterogéneos y los protocolos que servían para un tipo de observatorio podían no ser útiles para otro. Por ejemplo, la eficiencia de la extracción de la clorofila con etanol o acetona varía con el tipo de ambiente (agua dulce o salina), por lo que se definió incluir ambos métodos. Por otro lado, en el caso particular de la extracción de ADN, los sitios que ya analizaban ADN ambiental previamente a la constitución de la Red, empleaban distintos procedimientos (por ejemplo, kit comercial o técnica casera; extracción con SDS o CTAB, etc.) y no se encontró un criterio común para elegir un único protocolo, por lo que se decidió no establecer una metodología particular. Sin embargo, en el presente libro incluimos una de las metodologías más utilizadas en los actuales sitios-observatorios para extracción de ADN. Toda esta información se compiló en un documento que se compartió con los grupos de los observatorios para iniciar los muestreos pilotos de la Red, con protocolos estandarizados que permitieran evidenciar y discutir ventajas y dificultades de los mismos durante este período inicial, en la segunda reunión de la Red. En noviembre de 2019, se realizó el segundo encuentro  $\mu$ SudAqua en Chascomús (Buenos Aires, Argentina), en donde tuvo lugar el segundo taller de la Red de Observatorios Microbianos. Allí se mostraron los resultados preliminares de los primeros meses de muestreo, y se continuó trabajando sobre distintos aspectos de la Red, poniendo en común avances y dificultades, y estableciendo nuevas metas. Hasta ese encuentro, la Red incluía observatorios localizados en Costa Rica, Brasil, Uruguay y Argentina, cuyas comunidades microbianas y principales características limnológicas se monitoreaban bimestralmente. La red de observatorios contaba en ese entonces con diferentes ecosistemas acuáticos entre los

que se incluían 8 sitios de monitoreo (período 2019-2020): 4 lagos/lagunas, 2 ríos, 1 estuario y 1 sitio marino. De lo discutido en esa reunión, y dada la imposibilidad de unificar todos los protocolos, se replanteó el objetivo inicial y se consensuó mantener el documento con los protocolos más comunes o utilizados. En este documento, los procedimientos para la mayoría de los parámetros se encuentran unificados, mientras que en algunos casos se presenta más de una opción metodológica, dependiendo del tipo de ambiente analizado (agua dulce o marino) y otros se dejan a criterio de cada sitio (por ej., ADN ambiental). Además, considerando dudas metodológicas de algunos protocolos, se grabaron e incluyeron en el documento videos explicativos de algunas de las técnicas.

En el año 2020, como consecuencia de la pandemia por Covid-19, la mayoría de los sitios discontinuó su muestreo por un período de al menos un año y medio. Luego de una reunión virtual de la Red en octubre del 2021, se definió retomar con los muestreos sincronizados en todos los sitios en abril del 2022 y se alentó la incorporación de nuevos sitios-observatorios en la siguiente etapa. Actualmente, la Red cuenta con 13 sitios-observatorios activos constituidos por los siguientes ambientes: 3 lagunas, 4 ríos, 2 estuarios y 4 sitios marinos (<https://microsudaqua.netlify.app/>).

Presentamos aquí el **Libro de Protocolos Estandarizados** de la Red de Observatorios como una guía consensuada en la Reunión del año 2019 en Chascomús, y que utilizamos actualmente todos los sitios-observatorios para realizar los muestreos.

Diciembre de 2023



## ***Participantes de la Red de Observatorios Microbianos (2017-2023)***

### **Argentina**

Allen Dohle, Sharon - INIBIOMA (UNComahue-CONICET)

Baliña, Sofía - IEGEBA (CONICET-UBA)

Barrena, Maité - CIMAS-CONICET

Bastidas Navarro, Marcela - INIBIOMA (UNComahue-CONICET)

Bernal, María Carolina - IEGEBA (CONICET-UBA)

Burgueño, Giuliana; CIMAS-CONICET, ESCiMar, UNCo

Cetra, Nicolás; CIMAS-CONICET, ESCiMar, UNCo

Fermani, Paulina - IBIOMAR-CONICET

García, Patricia - INIBIOMA (UNComahue-CONICET)

Gerea, Marina - INIBIOMA (UNComahue-CONICET)

Gómez, Bárbara - Instituto Nacional del Agua (INA)

Gómez Lugo, Sebastián - IEGEBA (CONICET-UBA)

Graziano, Martín - IEGEBA (CONICET-UBA)

Huber, Paula - INALI - CONICET

Hünicken, Leandro - CIMAS (CONICET-UNS)

Izaguirre, Irina - IEGEBA (CONICET-UBA)

Lagomarsino, Leonardo - INTECH (CONICET-UNSAM)

Latorre, Maite - CADIC-CONICET

Lozada, Mariana - IBIOMAR-CONICET

Malits, Andrea - CADIC-CONICET

Mansilla Ferro, Carolina - INIBIOMA (UNComahue-CONICET)

Martyniuk, Nicolás - INIBIOMA (UNComahue-CONICET)

Miranda, Cecilia - IMIBIO - Gobierno de Misiones

Ojeda, Damian - INEDES (UNLu-CONICET-CIC)

O' Farrel, Inés - IEGEBA (CONICET-UBA)  
Padulles, María Luz - INEDES (UNLu-CONICET-CIC)  
Porcel, María Sol - IEGEBA (CONICET-UBA)  
Quiroga, María Victoria - INTECH (CONICET-UNSAM)  
Saad, Juan - CIMAS-CONICET, ESCiMar, UNCo  
Sabio y García, Carmen - Universidad de Buenos Aires (UBA)  
Salas, Cecilia - CIMAS-CONICET  
Sánchez, María Laura - IEGEBA (CONICET-UBA)  
Santucho, Gladys Janet - INTECH (CONICET-UNSAM)  
Saraceno, Martín - IEGEBA (CONICET-UBA)  
Schiaffino, Romina - CIT NOBA (CONICET-UNNOBA)  
Soto Cárdenas, Carolina - INTECH (CONICET-UNSAM)  
Torremorell, Ana - INEDES (UNLu-CONICET-CIC)  
Unrein, Fernando - INTECH (CONICET-UNSAM)

## **Brasil**

Araujo-Paina Karime - Universidade Federal de São Carlos  
Arboleda-Baena, Clara María - Universidade Federal de São Carlos  
Cassiano-Oliveira, Israel - Universidade Federal de São Carlos  
Costa, Mariana - Universidade Federal do Rio Grande do Norte  
de Melo, Michaela - Université du Québec à Montréal  
Espolau, Greyce - Universidade Federal de São Carlos  
Guido-Giongo, Daniel - Universidade Federal de São Carlos  
Hummer, Eloisa - Universidade Federal de São Carlos  
Junger, Pedro - Universidade Federal de São Carlos  
Lacativa Bagatini, Inessa - Universidade Federal de São Carlos

Perbiche Neves, Gilmar - Universidade Federal de São Carlos

Mateus-Barros, Erick - Universidade Federal de São Carlos

Sarmento, Hugo - Universidade Federal de São Carlos

### **Costa Rica**

Gómez, Eddy - Universidad de Costa Rica

### **Uruguay**

Alonso, Cecilia - CURE-UdelaR

González, Belén - CURE-UdelaR

Griffero, Luciana - CURE-UdelaR

Zanetti, Juan - CURE-UdelaR

### **Protocolos**

Protocolo de Clorofila-a: Romina Schaffino y Maria Laura Sánchez

Protocolo de Fitoplancton cuantitativo: María Laura Sánchez y Romina Schiaffino

Protocolo de Citometría: Fernando Unrein y Andrea Malitz

Protocolos de Nutrientes Disueltos: Martín Graziano, Leonardo Lagomarsino

Protocolo de Nutrientes Totales: María Luz Padulles y Eddy Gómez

Protocolo de ADN ambiental: Carmen Sabio y García, Luciana Griffero, Paulina Fermani

Protocolo de Materia orgánica disuelta y Carbono orgánico disuelto: Marina Gereá

## Índice

<b>Indicaciones generales para realizar los muestreos</b> .....	1
<b>Sección 1: Preparación del material para el muestreo</b> .....	2
1.1 Clorofila-a y Nutrientes.....	3
1.2 Fitoplancton cuantitativo.....	3
1.3 Citometría.....	4
1.4 ADN ambiental.....	5
1.5 Carbono Orgánico Disuelto (COD) y Materia Orgánica Disuelta (MOD).....	6
<b>Sección 2: Material para llevar a campo y protocolo de muestreo</b> .....	7
2.1 Mediciones en el campo.....	8
2.2 Clorofila-a y Nutrientes.....	8
2.3 Fitoplancton cuantitativo .....	8
2.4 Citometría.....	8
2.5 ADN ambiental.....	10
2.6 Carbono Orgánico Disuelto (COD) y Materia Orgánica Disuelta (MOD) .....	10
<b>Sección 3: Protocolo de análisis en el laboratorio</b> .....	11
3.1 Turbidez.....	12
3.2 Clorofila-a y Nutrientes.....	12
3.2.1 Determinación de Clorofila-a.....	13
3.2.2 Nutrientes disueltos.....	15
3.3 Fitoplancton cuantitativo.....	15
3.4 Citometría.....	16
3.5 ADN ambiental.....	17
3.6 Carbono Orgánico Disuelto (COD) y Materia Orgánica Disuelta (MOD) .....	20
<b>Sección 4: Bibliografía</b> .....	23
<b>Sección 5: Epílogo</b> .....	24

---

## Indicaciones Generales para realizar los muestreos

En esta sección se indica cómo se realizarán los muestreos, con qué frecuencia, en qué lugar del cuerpo de agua y qué parámetros se medirán.

### **Muestreos:**

- ✓ Muestreo mensual preferentemente (eventualmente bimestral).
- ✓ Muestreos matutinos, durante la segunda quincena del mes. De ser bimestral, durante los meses pares (febrero, abril, junio, agosto, octubre, diciembre)
- ✓ Se muestrea en la capa fótica del cuerpo de agua.
- ✓ Forma de identificar las muestras: **DOS LETRAS PARA SITIO\_aammdd**

### **Parámetros a medir:**

#### **1) Clorofila-a (Chl-a)**

#### **2) Nutrientes:**

- Nutrientes totales ----> Fósforo total (FT), nitrógeno total (NT)
- Nutrientes disueltos ----> Amonio ( $\text{NH}_4^+$ ), nitratos ( $\text{NO}_3^-$ ), fosfatos ( $\text{PO}_4^+$ )

#### **3) Fitoplancton cuantitativo**

#### **4) Citometría**

- Bacterias heterótrofas
- Picoplancton y nanoplancton autotrófico

#### **5) ADN ambiental**

#### **6) Materia Orgánica Disuelta (MOD) y Carbono Orgánico Disuelto (COD)**

## Preparación del material para el muestreo

Los materiales para tener en cuenta en la realización del muestreo se resumen en el siguiente listado. En los apartados posteriores se detallan las particularidades de cada parámetro a medir:

- ✓ Frascos plásticos de 250 o 500 o 1000 ml (para medición de nutrientes totales, nutrientes disueltos/Clorofila-a, fitoplancton, ADN ambiental, COD/MOD). Para Clorofila-a y ADN ambiental en ambientes marinos coleccionar la muestra en bidones de 5L.
- ✓ HCl 10%
- ✓ Agua destilada o agua ultrapura (ej. Milli-Q®)
- ✓ Solución de Lugol acidificado (1%) (fitoplancton)
- ✓ Crioviales estériles de 5 ó 4,5 ml con fijador a definir para cada cuerpo de agua (para análisis procariotas, piceucariotas y nanoplancton por citometría)
- ✓ Cajas para guardar crioviales (citometría)
- ✓ Termo de N<sub>2</sub> Líquido (citometría)
- ✓ Pipeta y puntas (tips)
- ✓ Botella Niskin o Van Dorn (dependiendo del sitio)
- ✓ Malla de 50  $\mu$ m

Las particularidades de cada parámetro a medir están detalladas en los siguientes párrafos.

## 1.1 Clorofila-a y Nutrientes

Clorofila-a y Nutrientes disueltos: lavar frascos plásticos con HCl 10%. Luego enjuagar al menos 3 veces con agua destilada o ultrapura. El tamaño del frasco dependerá del volumen que se requiera filtrar para la determinación de la concentración de clorofila-a. El agua filtrada se recuperará para determinar la concentración de los nutrientes disueltos.

Nutrientes totales: lavar frascos plásticos de 250 o 500 ml con HCl 10%. Luego enjuagar al menos 3 veces con agua destilada o ultrapura.

## 1.2 Fitoplancton cuantitativo

Lavar una botella/frasco de 200-500 ml con agua destilada y preparar el Lugol acidificado.

### Preparación de Lugol acidificado:

- ✓ Preparar 200 ml de Lugol 13,6% (30 gramos de soluto en 220 ml de solución = 13,6%*m/v*): 20 g IK + 10 g I<sub>2</sub> en 200 ml de agua destilada (conviene hacerlo con agitador magnético para que sea más rápido) + 10% de ácido acético glacial (20 ml).

Nota 1: La solución de Lugol acidificada se conserva en oscuridad y heladera (4°C), protegiendo el frasco con papel aluminio.

Nota 2: El Lugol también se consigue preparado, el mismo debe ser acidificado con 10% de ácido acético glacial.

### 1.3 Citometría

A continuación, se detallan los materiales que se necesitan para preparar las muestras de citometría, según el fijador que se vaya a utilizar (P+G, Glutaraldehído o GlyTE) y el tipo de organismos a preservar (bacterias, picoautótrofos y nanoplancton):

- Rotular crioviales de 4,5 ml y agregar 400  $\mu$ l del conservante que use en el laboratorio (bacterias, picoautótrofos y nanoplancton)

El stock de crioviales con el conservante alicuotado se almacena en freezer a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

A continuación, se detallan las preparaciones de los fijadores, según el tipo de organismos a preservar y sitio de muestreo.

#### Preparación de P+G:

Trabajar bajo campana de extracción.

Para preparar 1 litro de P+G (1% Paraformaldehído + 0.05% Glutaraldehído final):

- Calentar 800 ml de PBS 1X a  $60^{\circ}\text{C}$  y mantener a esa temperatura con agitador magnético con calefacción.
- Agregar 100 g de Paraformaldehído
- Agregar lentejas de NaOH de a una y seguir agitando hasta que la solución se clarifique (debería tardar entre 1-5 min.)
- Sacar del calor
- Agregar 20 ml de Glutaraldehído al 25%.
- Ajustar a pH = 7,2 con HCl
- Llevar a 1 litro con PBS 1X.
- Filtrar a través de filtro de policarbonato de 0,22  $\mu\text{m}$ .
- Alicuotar 400  $\mu$ l en cada criovial.
- Almacenar en freezer a  $-20^{\circ}\text{C}$  (preferentemente a  $-80^{\circ}\text{C}$ ).

Nota: una vez descongelado el fijador debe guardarse a  $4^{\circ}\text{C}$  y usarse dentro de la semana o descartarse.



### Preparación de GlyTE (solución de glicerol + buffer TE):

- Preparar 100 ml de solución EDTA 0,5 M:
  - > Poner 18.6 g EDTA + 80 ml agua ultrapura (Mientras se mezcla con el agitador magnético, ajustar a pH = 8 agregando lentamente NaOH).
  - > Agregar agua ultrapura hasta un volumen final de 100 ml.
  - > Filtrar a través de 0,22  $\mu\text{m}$ .
  
- Preparar 100X TE (1 M Tris; 100 mM EDTA):
  - > Poner 12,1 g de TRIS + 20 ml de 0,5 M EDTA (previamente preparado)
  - > Añadir agua ultrapura hasta 80 ml (Mientras se mezcla con el agitador magnético, ajuste a pH = 8 agregando lentamente HCl al 37%).
  - > Agregar agua ultrapura hasta un volumen final de 100 ml.
  - > Filtrar a través de 0,22  $\mu\text{m}$ .
  
- Preparación de stock de GlyTE:
  - > Mezclar:
    - 20 ml 100x TE pH 8,0
    - 60 ml de agua ultrapura
    - 100 ml de glicerol de grado molecular (usar jeringa)
  - > Pasar el stock de GlyTE a través de un filtro de 0,22  $\mu\text{m}$  y almacenar refrigerado (4°C).
  - > El GlyTE recién preparado y filtrado se alicuota en los crioviales. El volumen que se conserve sin alicuotar debe volver a filtrarse antes de usar.

Nota: autoclavar las soluciones de 0,5M EDTA restantes y 100X TE y almacenar hasta la próxima preparación de GlyTE.

#### **1.4 ADN ambiental**

Lavar botellas de plástico de 250, 500 ml o un mayor volumen (si fuera necesario) con HCl 10 % (1 vez). Luego lavar 2-3 veces con agua destilada, y finalizar con 1 lavado de agua ultrapura. El tamaño de la botella dependerá del volumen que se filtre posteriormente.

Lavar un sistema de filtración de la misma manera que las botellas, para utilizar en el laboratorio.

*Nota: en general, se filtran entre 100 y 300 ml de muestra en sistemas de agua dulce. En lagunas hipereutróficas como Chascomús, se filtran entre 30 y 50 ml. En el mar, se filtran entre 1 a 4 litros.*

### **1.5 Carbono Orgánico Disuelto (COD) y Materia Orgánica Disuelta (MOD)**

Lavar una botella de 250 mL de plástico 1 vez con HCl 10%, y posteriormente al menos 3 veces con agua destilada para llevar a campo y recolectar muestras de agua.

Lavar un sistema de filtración de vidrio con HCl 10 %, enjuagar al menos 3 veces con agua destilada y 1 vez con agua ultrapura y muflar a 440°C durante al menos 1 hora. Por otra parte, seguir el mismo protocolo de lavado que para el sistema de filtración con los frascos de color caramelo de 100 ml de capacidad que se usarán para la determinación de COD y MOD, y muflar a 440°C durante al menos 1 hora. El sistema de filtración y los frascos serán usados en el laboratorio, luego del muestreo.

---

## 2.

### ***Material para llevar a campo y protocolo de muestreo***

A continuación, se enumeran los materiales necesarios para llevar al campo:

- ✓ Planilla de campo
- ✓ pHmetro
- ✓ Conductímetro
- ✓ Oxímetro y sensor de temperatura
- ✓ Disco de Secchi
- ✓ Botella Niskin o Van Dorn (dependiendo del sitio)
- ✓ Pipeta y puntas
- ✓ Rotulador
- ✓ Red de 50  $\mu\text{m}$  o similar
- ✓ Heladera, hielo y/o friopack
- ✓ Termo de N<sub>2</sub>-Líquido (para citometría)
- ✓ Frascos plásticos de 250 o 500 ml previamente lavados (nutrientes totales, nutrientes disueltos/Clorofila-a, fitoplancton, ADN ambiental, COD/MOD)
- ✓ Lugol acidificado y pipeta pasteur de plástico (fitoplancton)
- ✓ Crioviales de 4,5 ml con P+G (citometría): bacterias, picoautótrofos y nanoplancton
- ✓ Crioviales de 4,5 ml con GlyTE (citometría): bacterias, picoautótrofos y nanoplancton
- ✓ Ecosonda o vara graduada para medir nivel de agua
- ✓ Piseta con agua destilada para lavar los sensores de campo (Conductímetro, pHmetro, Oxímetro) y papel para secar.

## Procedimientos:

### **2.1 Mediciones en el campo**

Registrar la temperatura del agua, pH, conductividad y oxígeno disuelto utilizando sensores de campo y siguiendo las indicaciones del equipo a utilizar.

Identificar y relevar variables relevantes para los distintos ambientes. Por ej., en arroyos, se puede medir el ancho, la profundidad, la velocidad corriente, el caudal, el tipo de vegetación circundante, etc. En lagos y mar, la transparencia por disco de Secchi, la vegetación circundante, la profundidad, etc.

### **2.2 Clorofila-a y Nutrientes**

Colectar la muestra de agua sin filtrar en los frascos plásticos previamente lavados y trasladar las muestras en frío (4°C) y oscuridad.

### **2.3 Fitoplancton cuantitativo**

Colectar entre 200 y 500 ml (dependiendo del sitio de estudio) de agua subsuperficial sin filtrar y guardar en una botella/frasco previamente lavado. Fijar la muestra con Lugol acidificado al 1% (concentración final). Conservar en frío (4°C) y oscuridad hasta su posterior recuento.

*Nota: si no se recuenta rápidamente, revisar las muestras, y agregar una gota de Lugol acidificado (1%), para que no pierda su color, y seguir conservando.*

### **2.4 Citometría**

Tomar muestras de agua y pre-filtrar por malla de zooplancton (red de 50  $\mu\text{m}$ ).

Incorporar la muestra a los distintos crioviales, que contienen distintos conservantes, según el sitio de estudio y microorganismos a analizar:

- Bacterias, picoautótrofos y nanoplancton: Agregar 4 ml de muestra a los crioviales de 4,5 ml con 400  $\mu$ l del conservante/fijador elegido (GlyTE o P+G)
- Homogeneizar cada muestra por inversión y mantener durante 10 minutos en oscuridad.
- Luego, sumergir cada muestra en N<sub>2</sub>-Líquido hasta congelamiento y almacenar a - 80°C dentro de la caja respectiva (de no ser posible guardar a -20°C).

Nota: video-tutorial disponible en la carpeta compartida sobre el procesamiento de las muestras para su conservación:

[https://drive.google.com/file/d/1h6cbLzvIX\\_OJ5IX1of0xe03nkOW6sWsh/view?usp=sharing](https://drive.google.com/file/d/1h6cbLzvIX_OJ5IX1of0xe03nkOW6sWsh/view?usp=sharing)



Notas a tener en cuenta para la correcta preservación de las muestras para citometría:

- Fijar la muestra lo más rápido posible tratando de evitar que el conservante quede descongelado y a temperatura ambiente mucho tiempo, particularmente si se utiliza P+G.
- Idealmente, llevar el bidón de N<sub>2</sub>-Líquido al sitio de muestreo y fijar la muestra *in situ*.
- De no ser posible esta opción, coleccionar la muestra y transportarla en oscuridad y frío (4°C) hasta el laboratorio y fijarla lo más rápido posible.
- El P+G una vez descongelado debe utilizarse inmediatamente para fijar la muestra. De no ser utilizado inmediatamente puede ser guardado a 4°C por una semana como máximo. Transcurrido este tiempo debe descartarse. No puede ser vuelto a congelar ni mantenido a temperatura ambiente por tiempo prolongado, ya que se altera la eficiencia de la fijación.

- El **congelamiento** es una parte clave para la preservación de la muestra. Lo importante es que el congelamiento de la muestra fijada sea lo más rápido posible, de ahí la necesidad de contar con N<sub>2</sub>-Líquido. De no poseer N<sub>2</sub>-Líquido, entonces congelar directamente a -80°C, y si tampoco se dispone de -80°C, congelar directamente a -20°C, aunque esta última opción, no se recomienda.
- En conclusión: **más frío => más rápido se congela => mejor calidad de la muestra!**
- **La muestra no debe descongelarse hasta que se vaya a analizar.** ¡Si se transportan muestras ya fijadas deben transportarse congeladas!

## 2.5 ADN ambiental

Enjuagar las botellas previamente lavadas, 2 veces con el agua del sitio y coleccionar la muestra. Es recomendable, sobre todo en los sitios más impactados, pre-filtrar con un tamiz de 50 µm.

Trasladar la muestra al laboratorio en frío (4°C).

## 2.6 Carbono Orgánico Disuelto (COD) y materia orgánica disuelta (MOD)

Colectar 250 ml de muestra de agua (alcanza para ambas mediciones) en el frasco plástico previamente lavado.

Trasladar la muestra en oscuridad y a temperatura ambiente o en frío.

---

### 3.

#### ***Protocolo de análisis en el laboratorio***

A continuación, se enumeran los materiales necesarios para utilizar en el laboratorio, luego de extraer las muestras de campo:

- HCl 10%
- Agua destilada y/ó ultrapura
- Sistema de filtración (Nutrientes disueltos/Clorofila-a y ADN)
- Reactivos, tipo Hach (Nutrientes disueltos)
- Peroxodisulfato de dipotasio ( $K_2O_8S_2$ ) (Nutrientes totales)
- Ácido Bórico ( $H_3BO_3$ ) (Nutrientes totales)
- NaOH 1M (Nutrientes totales)
- Filtros tipo Whatman GF/F de 0,7  $\mu m$  tamaño de poro muflados a 450°C durante al menos 4 horas (Nutrientes disueltos/Clorofila-a)
- Papel aluminio (Clorofila-a)
- Sistema de filtración de vidrio lavado con ácido y muflado a 440°C durante al menos 1 hora (COD y MOD)
- Filtros de policarbonato de 0,22  $\mu m$  de poro (tipo Millipore GTTP04700) (ADN)
- Filtros de 3  $\mu m$  de poro (opcional ADN)
- Filtros de fluoruro de polivinilideno (PVDF) ó Membrana GV (Millipore - GVWP04700) de 0,22  $\mu m$  de poro (COD y MOD)
- Frasco color caramelo de 100 ml de capacidad muflado a 440°C durante al menos 1 hora (COD y MOD)
- Turbidímetro (en caso de disponer)
- Espectrofotómetro UV con capacidad de realizar espectros de absorción

Procedimientos:

**3.1 Turbidez**

- En caso de contar con un Turbidímetro, separar un volumen para la medición de turbidez por Turbidimetría, a partir del equipo utilizado por cada grupo.

Nota: en caso de no contar con turbidímetro, puede realizar la determinación de sólidos totales en suspensión a partir de protocolos APHA.

**3.2 Clorofila-a y Nutrientes**

Nutrientes totales:

- Los frascos con las muestras extraídas del campo se almacenan a -20°C hasta su determinación.
- Disolver 5 g de peroxodisulfato y 3 g de Ácido Bórico con 35 ml de NaOH y llevar a 100 ml con agua ultrapura (El peroxodisulfato tarda mucho en disolver, utilizar agitador magnético)
- Una vez disuelto utilizar en proporción 4 ml de reactivo: 30 ml de muestra
- Autoclavar 90 minutos
- Enfriar y filtrar
- Realizar las determinaciones de Fósforo Reactivo Soluble y Nitratos
- La determinación se realizará por métodos APHA o EPA. Para agua de mar, recomendamos seguir métodos de Strickland-Parsons (1972).

Clorofila-a y Nutrientes disueltos:

- Inmediatamente luego del campo, filtrar un volumen determinado de muestra por filtros tipo Whatman GF/F de 0,7  $\mu\text{m}$  de tamaño de poro muflados. Es importante mantener el material protegido de la luz para reducir la fotooxidación. Filtrar agua hasta que se colmate el filtro. El volumen a filtrar dependerá del material en suspensión, por lo tanto, en ambientes eutróficos, se utilizará poco volumen



alrededor de 50 a 150 ml, mientras que en ambientes oligotróficos o marinos pueden ser entre 1000 y 2000 ml.

- Registrar el volumen filtrado.
- Colocar el filtro (doblado a la mitad con la parte filtrada sobre sí misma) en un sobrecito de papel de aluminio rotulado (fecha, nombre del cuerpo de agua, mililitros filtrados y cantidad de filtros).
- Conservar en freezer a  $-20^{\circ}\text{C}$  para facilitar la ruptura de las paredes celulares y la liberación del pigmento. Se pueden guardar los filtros por hasta 3 semanas.

Nota 1: El filtro se utilizará para la determinación de Clorofila-a (Sección 3.2.1).

Nota 2: El agua filtrada se utilizará para la determinación de Nutrientes disueltos (Sección 3.2.2).

### 3.2.1 Determinación de Clorofila-a:

Este paso puede realizarse unos días después de haber filtrado la muestra y haberla guardado a  $-20^{\circ}\text{C}$ , pero se recomienda hacerlo antes de cumplir las 3 semanas de almacenamiento.

- Cortar los filtros en pedazos pequeños (5 ó 6 porciones) y colocarlos en frascos o tubos forrados con papel de aluminio. Agregar 8 ml de etanol absoluto caliente (entre  $60^{\circ}\text{C}$  y  $70^{\circ}\text{C}$ ) por tubo, como solvente de extracción. En caso de haber utilizado 2 filtros para una misma muestra, colocar 12 ml de solvente de extracción.
- Pasar por un vórtex o agitar vigorosamente y asegurarse de que los pedazos de filtro queden sumergidos en el etanol.
- Registrar el volumen de solvente agregado. El etanol absoluto debe ser llevado a temperatura en un recipiente adecuado y utilizando un baño maría. Controlar la temperatura con un termómetro dentro del etanol.
- Dejar en reposo y en oscuridad durante 24 hs en heladera ( $4^{\circ}\text{C}$ ) para facilitar la extracción de los pigmentos fotosintéticos.

Al día siguiente de la extracción:

- Centrifugar unos 10 minutos la muestra a 3.500 O 4.000 rpm
- Proceder a leer en el espectrofotómetro la Absorbancia a 665 y 750 nm. Previamente realizar un blanco con etanol puro.
- En la misma cubeta agregar 1 gota de HCl 1 N y luego de 1 minuto volver a leer la Absorbancia a ambas longitudes de onda. No excederse con la colocación de HCl porque algunos pigmentos accesorios pueden cambiar su absorbancia a la de la feofitina-a e interferir con la determinación.

*Fórmula para el cálculo de la concentración de Clorofila-a:*

$$[\text{Clorofila-a sin feopigmentos}] = F [(Abs_{1665} - Abs_{1750}) - (Abs_{2665} - Abs_{2750})] k v$$

donde Clorofila-a sin feopigmentos se expresa en  $\mu\text{g}$  por litro; Abs1= Absorbancia antes de acidificar; Abs2= Absorbancia después de acidificar; F = es un factor de corrección para equiparar la reducción en la absorbancia con la Clorofila-a inicial (2,43 para el etanol, 2,72 para el metanol y 2,43 para la acetona); k = coeficiente de absorción específica (11,2 para el etanol, 11,62 para el metanol y 10,48 para acetona); v = volumen del extracto en ml / (volumen muestra en litros x espesor cubeta en cm).

Consideraciones:

- ✓ Utilizar Etanol absoluto para análisis.
  - ✓ Utilizar las cubetas exclusivas para clorofila. Lavar con detergente EXTRAN y luego lavar nuevamente con etanol.
  - ✓ Calibrar con etanol puro a 665 nm y a 750 nm para blanco.
  - ✓ Calibrar nuevamente cada 4 muestras para comprobar la calibración
  - ✓ Lavar las cubetas con etanol entre muestra y muestra.
- Extracción con acetona para agua marina/salada:

- Seguir los mismos pasos detallados en el protocolo anterior, pero en lugar de utilizar etanol absoluto caliente, utilizar acetona (sin calentar) para fitoplancton marino, como solvente de extracción.

*Consideraciones:*

- ✓ Utilizar Acetona 90% para análisis.
  - ✓ Utilizar las cubetas exclusivas para clorofila. Lavar con detergente EXTRAN y luego lavar nuevamente con acetona.
  - ✓ Calibrar con acetona pura a 665 nm y a 750 nm para blanco.
  - ✓ Calibrar nuevamente cada 4 muestras para comprobar la calibración
  - ✓ Lavar las cubetas con acetona entre muestra y muestra.
- Extracción con metanol para agua dulce:

Alternativamente al uso de etanol caliente se puede utilizar metanol como solvente de extracción. Si el grupo de trabajo va a utilizar este solvente hay que realizar una intercalibración previa para chequear la capacidad de extracción de ambos solventes. Los pasos a seguir son los mismos detallados en el protocolo con etanol absoluto.

3.2.2 Nutrientes disueltos:

Se recomienda realizar la determinación en el día o en los días siguientes inmediatos. Si la medición de nutrientes no se realiza el mismo día, el filtrado se almacena a -20°C hasta su determinación.

Nota: la determinación de cada uno de los parámetros se realizará por métodos APHA o EPA. Recomendamos: Amonio, método de salicilato (EPA Method 350.1) - método fenato alternativo, APHA 4500-NH3-F; Nitratos: método de reducción por cadmio, APHA 4500-NO3-E; Ortofosfato: método de vanadato-molibdato, APHA 4500-P-C - método ácido ascórbico, APHA 4500-P- E. Para agua de mar, recomendamos seguir métodos de Strickland-Parsons (1972).

### 3.3 Fitoplancton cuantitativo

- Conservar la muestra refrigerada (4°C) y en oscuridad, hasta su posterior cuantificación por microscopio invertido.

Nota: El fijado con Lugol requiere control periódico del color de las muestras almacenadas, a fin de reponer el Lugol faltante por oxidación del yodo. Si las muestras se observan decoloradas, agregar una gota de Lugol acidificado nuevamente.

### 3.4 Citometría

Utilizando un citómetro de flujo, se analizarán las muestras extraídas y conservadas de bacterias heterótrofas (3.4.1), picoplancton autotrófico (3.4.2) y nanofitoplancton autotrófico (3.4.3).

Dado que cada grupo tiene acceso a diferentes tipos de citómetros no es posible estandarizar los "settings", sin embargo, sí se puede establecer algunos criterios de análisis. En general:

- El "threshold" de los "settings" **siempre** deben ser colocados en la fluorescencia "FL1 o FITC" para las tinciones con SybrGreen y "FL3 o PerCP" para las algas.
- Agregar esferas de látex fluorescentes amarillo-verdosas ("beads Yellow-Green") de 1  $\mu\text{m}$  de diámetro para usar como referencia de tamaño y fluorescencia.
- Registrar el volumen de muestra y de dilución, la velocidad, la tensión, los ajustes y el nombre del archivo.

#### 3.4.1 Bacterias heterótrofas:

- Las bacterias se tiñen con SybrGreen I.

Preparación de la Solución de Trabajo (working solution -WS-) de SybrGreen I:

- La WS 100X de SybrGreen I se prepara diluyendo 1:100 veces el stock comercial (10.000X) en DMSO.
- Para analizar la muestra en el citómetro se tiñen 100  $\mu$ l de muestra con 1  $\mu$ l de WS (1X concentración final).
- Incubar a temperatura ambiente por 10 minutos en oscuridad antes de pasar la muestra por el citómetro.
- Las bacterias se analizan típicamente en dos bi-plots: FL1-SSC y FL3-FL1

#### 3.4.2 Picoplancton autotrófico:

- Las muestras se analizan en el citómetro sin teñir.
- Se utilizan típicamente los bi-plots: FL3-SSC, FL3-FL2 y FL3-FL4. Los últimos dependen de si las picocianobacterias presentes en las muestras son ricas en ficoeritrina (FL2) o en ficocianina (FL4).

#### 3.4.3 Nanofitoplancton autotrófico:

- Se utiliza la misma muestra y los mismos plots que para el picoplancton autotrófico, pero modificando los "settings" (bajando el voltaje), de modo de ubicar los picoeucariotas abajo a la izquierda de forma que se visualice mejor toda la población de nanofitoplancton.

### **3.5 ADN ambiental**

#### ***Procedimiento de filtración y conservación***

- Desinfectar la mesada y material de trabajo con etanol 70%
- Filtrar con filtros de 0,22  $\mu$ m entre 100 y 300 ml de muestra, excepto en el mar que se filtrará entre 1 y 4 litros. Para ello, se utilizará un sistema de filtración previamente lavado 1 vez con HCl 10%, 2 veces con agua destilada y 1 vez con agua ultrapura. Nota: se puede utilizar este mismo filtrado (entre 100 y 150 ml del

volumen filtrado) y conservarlo en frasco de vidrio color caramelo para la medición de COD.

- Conservar los filtros en un criovial o eppendorf estéril sin buffer a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

Nota 1: En los sitios muy impactados es recomendable filtrar con filtros de  $3\ \mu\text{m}$  previo a la filtración por filtros de  $0,22\ \mu\text{m}$  para evitar la colmatación del último filtro con partículas en suspensión.

Nota 2: video-tutorial disponible en la carpeta compartida sobre el procedimiento de filtrado:

<https://drive.google.com/file/d/1h7XTJY8vcSX59xdISlInn6uTrGJpcbAK/view?usp=sharing>



### **3.5.1 Procedimiento de extracción del ADN ambiental**

La red no cuenta con un procedimiento estandarizado para la extracción de ADN y cada sitio usa sus propios protocolos. A modo orientativo, dejamos dos referencias para realizar un procedimiento de extracción mediante un método casero (que es usado por varios de los sitios) y otro mediante un kit de extracción.

- a- Protocolo de extracción con buffer CTAB: *Fernández Zenoff et al. (2006)*
- b- Protocolo con kit de extracción: *Lozada et al. (2022)*.

**a-Protocolo CTAB** (Modificado de *Fernández Zenoff et al. (2006)*)

**CTAB seguido de la extracción con una solución de cloroformo y alcohol isoamílico:**

- 1) Realizar una solución de lisis buffer CTAB (Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide) (2% CTAB; 1,4M NaCl, 100 mM Tris-Cl pH = 8, 20 mM EDTA pH = 8). Esta solución se almacena a temperatura ambiente. Es estable varios años. Antes de usar se le agrega B-Mercaptoetanol al 0,2% final y se calienta a 60°C.
- 2) Alicuotar dicha solución de CTAB en eppendorfs de 2 mL e incorporar cada filtro
- 3) Incubar a 60 °C durante 30 minutos
- 4) Luego, se realizan dos pasos de purificación: agregar 0,7 ml de cloroformo-alcohol isoamílico (24:1) y centrifugar a 14.000 rpm durante 10 minutos

Nota 2: al centrifugar, tenga cuidado de orientar todos los tubos en la misma dirección, pues no es posible observar a simple vista el pellet que se formará
- 5) Recuperar la fase acuosa en otro tubo de 1,5 ml (teniendo cuidado de no eliminar los residuos restantes)
- 6) Luego, el ADN es precipitado en isopropanol frío

Nota 3: colocar en heladera durante al menos 15 minutos. Cuanto más tiempo esté el material en heladera, mayor será la precipitación, considere dejar precipitar el material durante toda una noche
- 7) Centrifugar a 14.000 rpm durante 10 minutos

Nota 4: al centrifugar, tenga cuidado de orientar todos los tubos en la misma dirección, pues no es posible observar a simple vista el pellet que se formará
- 8) Retirar el sobrenadante, evitando cuidadosamente el pellet
- 9) Luego, pasos de lavado serán necesarios, para esto, añadir etanol al 80% helado
- 10) Mezclar y centrifugar durante 2 minutos a 5.000 rpm

Nota 5: para ambientes oligotróficos, aumentar el tiempo a 7 minutos
- 11) Repetir el paso de etanol al 80%
- 12) Eliminar el sobrenadante, evitando el pellet
- 13) Secado y almacenamiento

Dejar secar el pellet al aire, con el eppendorf boca abajo para proteger el pellet, durante 15 minutos

Nota 6: se puede secar en SpeedVac
- 14) Resuspender el pellet en 100µL de agua ultrapura o miliQ®

Nota 7: en ambientes oligotróficos, resuspender en 50 $\mu$ L de agua ultrapura;

Nota 8: al añadir el agua, procurar lavar el lado donde está adherido el Pellet

16) Determinar la concentración de ADN en Nanodrop®, Picodrop® o Fluorómetro

17) Diluir el ADN a 10 ng/ $\mu$ L utilizando agua ultrapura o miliQ®

18) Almacenar en el congelador a -20°C.

#### **b- Utilizando kits de extracción**

El ADN se puede extraer utilizando "Fast DNA Spin Kit" (MP Biomedicals Inc. EE.UU.)

siguiendo las instrucciones del fabricante, y cuantificado con fluorómetro o Nanodrop®

Para muestras marinas se puede seguir los procedimientos de Lozada et al. (2022).

### **3.6 Carbono Orgánico Disuelto (COD) y materia orgánica disuelta (MOD)**

- Filtrar al menos 200 ml de muestra a través de filtros PVDF o GV (0,22  $\mu$ m) utilizando un sistema de filtración de vidrio previamente lavado y muflado.
- Almacenar la muestra filtrada en dos frascos de vidrio caramelo con tapa de teflón, previamente lavados y muflados. Uno de los frascos se destinará a la medición de COD y el otro para la de MOD. No colocar papel aluminio entre el frasco y la tapa del mismo

Nota 1: utilizar filtros de fluoruro de polivinilideno (PVDF), de Membrana GV (Millipore - GVWPO4700) de 0,22  $\mu$ m de poro o PES, utilizados previamente para la extracción de ADN

#### **3.6.1 Carbono orgánico disuelto (COD):**

- Conservar la muestra en oscuridad y a 4°C.
- Procesar la muestra en un analizador de carbono que determine NPOC (non purgable organiccarbon).

Nota 2: si el ambiente muestrado presenta mucha carga de materia orgánica (e.g. COD  $\geq$  10 mg/l) adicionar 3 gotas de HCl puro al frasco para su conservación.



### 3.6.2 Materia orgánica disuelta (MOD):

De ser posible, realizar la medición del espectro de absorción de la muestra inmediatamente después de filtrada. Para ello, tener la precaución de homogeneizar la temperatura de la muestra y del agua ultrapura que se utilizará como blanco del espectrofotómetro.

- Sumergir los frascos de muestras en un baño térmico a 20°C durante media hora antes de realizar la medición. Es importante homogeneizar las temperaturas para evitar ruido o variaciones irregulares del espectro entre los 700 y los 800 nm, rango que luego se utilizará para corregir la muestra.
- Una vez que las muestras se encuentren a 20°C, encender el espectro y dejar calentar las lámparas del equipo por al menos media hora.
- Para realizar la medición, deberá utilizar una cubeta de cuarzo de la longitud de paso de luz adecuada para el ambiente estudiado (i.e. 1 cm, 5 cm o 10 cm).
- Configurar el espectrofotómetro para medir un barrido del espectro de absorción de la muestra entre 200 y 800 nm. Extraer las absorbancias para trabajar luego.
- **Para optimizar y homogeneizar los cálculos el grupo GESAP (INIBIOMA-Bariloche) preparó una planilla Excel con macros para todos los miembros de la red de observatorios:**  
<https://docs.google.com/spreadsheets/d/1nzTMZoUEo0AXijHO5dEfODJC10MnaoyW/edit#gid=1978573616>



- Esta planilla calculará automáticamente los pasos que se detallan a continuación.
- Realizar una corrección de los espectros de absorción de la muestra *a posteriori* de la sustracción del espectro del agua ultrapura. Para ello, debe promediar las

absorbancias entre 700 y 800 nm y restar este promedio a cada una de las absorbancias del espectro completo.

- De acuerdo a su espectrofotómetro, las unidades de absorbancia (AU) deberán convertirse en coeficientes de absorción (Abs) de la siguiente manera:  $a = 2,303A/L$ , donde  $a$  es el coeficiente de absorción Neperiano ( $m^{-1}$ ),  $A$  es la absorbancia y  $L$  es la longitud del paso de luz por la cubeta (expresada en metros).
- Luego sobre los espectros corregidos y en transformados a coeficientes de Absorción deberá calcular:
  - a-  $a_{254}$
  - b-  $a_{350}$
  - c-  $a_{440}$
  - d- la pendiente espectral  $S_{275-295}$
  - e- SUVA 254 ( $a_{254}:COD$ )
  - f- SUVA 350 ( $a_{350}:COD$ )
  - g-  $S_R$
- Registrar en la planilla Excel provista por GESAP para cada muestra:
  - a- localización geográfica del sitio de muestreo,
  - b- volumen de muestra colectada (ml),
  - c- filtro utilizado (PVDF, GV o fibra de vidrio),
  - d- espectrofotómetro empleado,
  - e- tipo de cubeta (es decir, longitud del paso de la luz en metros, e.g. 0,01m o 0,1m).

**Bibliografía**

APHA (American Public Health Association) (1998). Standard methods for the examination of water and wastewater. En: Clescerl LS, Greenberg AE, Eaton AD (eds) Book 20. APHA, Washington, DC, p 4-487.

Fernández Zenoff V., Siñeriz F. & Farías M.E. (2006). Diverse responses to UV-B radiation and repair mechanisms of bacteria isolated from high-altitude aquatic environments. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(12), 7857-7863. <https://doi.org/10.1128/AEM.01333-06>

Lozada M., Zabala M.S., García P.E., Diéguez M.C., Bigatti G., Fermani P., Unrein F., Dionisi H.M. (2022). Microbial assemblages associated with the invasive kelp *Undaria pinnatifida* in Patagonian coastal waters: structure and alginolytic potential. *Sci. Total Environ.* 154629. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.154629>

Strickland J.D.H., Parsons T.R. (1972). A practical handbook of sea-water analysis, 2nd edn. J. Fish. Res. Board Can. 167, 311.

---

## 5.

### *Epílogo*

El trabajo en equipo y colaboración es imprescindible para llevar a cabo este gran proyecto. Sin dudas, el aporte de cada uno de nosotros y la predisposición a las reuniones virtuales y presenciales, son motores para llevar a cabo con entusiasmo los muestreos temporales y permiten planear la proyección a largo plazo de la Red de Observatorios Microbianos. Aquí, presentamos algunas fotos de las reuniones, integrantes junto con algunos sitios-observatorios latinoamericanos.



2017 - Grupo de Trabajo de la Red de Observatorios Microbianos (Uruguay)



2019 - Grupo de Trabajo de la Red de Observatorios Microbianos (Argentina)



2021 - Grupo de Trabajo de la Red de Observatorios Microbianos (reunión virtual)



2022 - Grupo de Trabajo de la Red de Observatorios Microbianos (Brasil)



Foto representativa de sitio-observatorio marino, Punta Este, Puerto Madryn, Chubut, Argentina (Foto: Paulina Fermani)



Foto representativa de sitio-observatorio lótico de agua dulce, Arroyo San Francisco, Claypole, Prov. Buenos Aires, Argentina (Foto: Martín Graziano)



Foto representativa de sitio-observatorio léntico de agua dulce, Laguna El Trébol, Bariloche, Prov. Río Negro, Argentina (Foto: Cristian D. Torres)

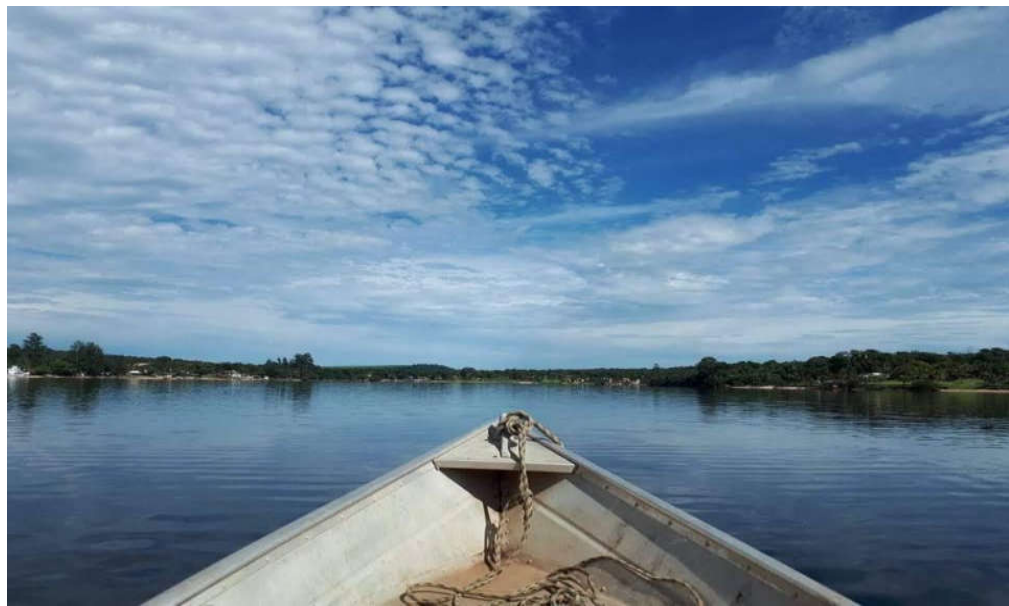


Foto representativa de sitio-observatorio léntico de agua dulce, Reservorio Broa, Itirapina, San Pablo, Brasil (Foto: Erick Mateus-Barros)

# REDE DE OBSERVATÓRIOS MICROBIANOS

Protocolos de padronização e amostragem de água na América Latina



**MICROSUDAQUA**

Red Colaborativa en Ecología Acuática Microbiana de América Latina



**Foto da Taca: Dr. Cristian D. Torres**

# **Rede de Observatórios Microbianos**

Protocolos de padronização e coleta de água na América Latina

Fermani Paulina, Gereá Marina, Graziano Martín, Sabio y García Carmen,  
Sánchez María Laura, Mateus-Barros Erick, Schiaffino Romina  
Compiladores

Cassiano-Oliveira Israel, Espolau Greyce, Garcia Nara, Mateus-Barros Erick  
Tradutores

2023

Primeira Edição

## Resumo

O impacto antrópico e os fatores climáticos atuam de forma conjunta sobre os ecossistemas como agentes de mudança, e muitas vezes os levam à deterioração. O efeito desses agentes depende da localização geográfica, clima, tipo de vegetação, entre outros fatores naturais e antrópicos que podem ser encontrados nos ambientes estudados. Para compreender o impacto destes fatores sobre os ecossistemas aquáticos e terrestres é importante contar com informações contínuas, padronizadas e estendidas no tempo.

Dentro dos ecossistemas aquáticos, as assembléias microbianas desempenham um papel fundamental nos ciclos da matéria e da energia; e, além disso, tem o potencial de ser indicadores robustos do estado ecológico e sanitário dos ambientes, devido a sua sensibilidade e rápida resposta às mudanças ambientais. Neste sentido, o monitoramento de longo prazo poderia fornecer informações valiosas sobre as características dos corpos d'água e as mudanças pelas quais estes passam.

Considerando estas premissas, durante a primeira reunião da Rede colaborativa em Ecologia Microbiana Aquática da América Latina ( $\mu$ SudAqua), realizada em La Paloma (Rocha, Uruguai) em dezembro de 2017, foi estabelecida a criação de um conjunto de observatórios cujo objetivo principal é avaliar de que maneira o impacto antrópico e de fatores climáticos, em um gradiente latitudinal, afetam a dinâmica da comunidade microbiana em nível continental. E assim nasceu a Rede de observatórios Microbianos da América Latina.

Os Observatórios são ferramentas valiosas que se estabeleceram ao redor do mundo para agregar informação sistematizada sobre as comunidades microbianas, porém, na América Latina são raros. Nesta Rede de Observatórios foram selecionados sítios-observatórios levando-se em conta a acessibilidade aos locais escolhidos, facilitando assim a continuidade das coletas. Os sítios-observatórios escolhidos contemplam uma frequência mínima bimestral e simultânea, na camada superficial da coluna d'água (zona eufótica), e a medição de parâmetros mais simples, para facilitar a continuidade de cada Observatório a longo prazo.

O **presente livro** pretende enumerar os protocolos estabelecidos e padronizados para a coleta de amostras de parâmetros físico-químicos e comunidades biológicas na água, além de análises posteriores no laboratório, levando em consideração os diferentes corpos d'água.

Esta Rede tem como objetivo fundamental fortalecer os laços de colaboração entre laboratórios de pesquisa de diferentes países Latinoamericanos e assim aumentar as capacidades e conhecimentos de cada grupo. Desta maneira, pretendemos promover o intercâmbio de saberes para encontrar respostas coletivas a perguntas que nos interessem regionalmente.

## Prólogo

*Fermani Paulina, Gereá Marina, Graziano Martín, Sabio y García Carmen, Schiaffino Romina.*

*Os observatórios microbianos são um valioso instrumento para a obtenção de informação sistematizada sobre as comunidades microbianas. Apesar disso, são encontrados poucos observatórios que contemplem amostragens de longo prazo na América Latina, devido principalmente à dificuldade em se manter a infraestrutura necessária para este tipo de atividade. Neste sentido, durante o primeiro encontro da Rede colaborativa em Ecologia Microbiana Aquática na América Latina ( $\mu$ SudAqua, <https://microsudaqua.netlify.app/>) realizada em dezembro de 2017, na cidade de Rocha (Rocha, Uruguai), foi proposta a criação de uma Rede de Observatórios Microbianos Aquáticos da América Latina. Ali foram lançadas as bases sobre os objetivos a longo prazo para a Rede. Assim, foi estabelecido como objetivo geral a formação de um conjunto de observatórios (sítios) para avaliar de que maneira o impacto antrópico e os fatores climáticos afetam a estrutura e dinâmicas de comunidades microbianas aquáticas, em um gradiente latitudinal e abrangendo uma área continental. Complementarmente, isto nos permitirá gerar um trabalho coletivo entre grupos latinoamericanos e assim fortalecer as pesquisas regionais e colaborativas.*

*Para a conformação inicial da Rede de Observatórios Microbianos Aquáticos da América Latina, na primeira reunião da Rede  $\mu$ SudAqua, foram propostos 8 observatórios abrangendo diferentes tipos de ambientes aquáticos (água doce, marinhos, lênticos, lóticos). Para alcançar uma continuidade de longo prazo nas coletas, se almejou que os sítios criados seguissem como critérios sua facilidade de acesso e que estivessem inseridos em projetos de pesquisa locais que auxiliassem na sustentabilidade dos esforços de amostragem. Estes sítios foram re-avaliados com base nas dificuldades encontradas durante a fase de consolidação da rede. Assim, as amostragens dos observatórios seguiram uma frequência mensal (eventualmente bimestral, a depender da acessibilidade do sítio), na superfície da coluna d'água (zona eufótica, epilímnio), e com a medição de parâmetros simples que facilitassem a continuidade em longo prazo do projeto. Posteriormente, se realizou um re-levantamento dos sítios propostos e a eventual incorporação de novos observatórios.*

*Para que fosse possível realizar uma análise em conjunto com os parâmetros de cada sítio, no primeiro encontro também foram definidas quais variáveis comuns seriam analisadas. Uma vez definidos os parâmetros, foi iniciado um longo processo de busca por protocolos para cada um deles. Neste sentido, buscou-se protocolos que, na medida do possível, poderiam ser utilizados nos diferentes contextos de cada observatório (rios, rios de cabeceira, lagos, estuários, etc). Por*

meio de pesquisas e intercâmbios virtuais, foram levantados os equipamentos, técnicas e protocolos utilizados por cada localidade e procurou-se chegar a um consenso sobre protocolos unificados para cada um dos parâmetros propostos. Durante este processo, ficou claro que os ambientes eram muito heterogêneos e que os protocolos que serviam para um tipo de observatório poderiam não se revelar úteis para outros. Por exemplo, a eficiência de extração da clorofila com etano ou acetona varia com o tipo de ambiente (água doce ou salgada), e por isso se decidiu incluir ambos os métodos. Por outro lado, no caso particular da extração de DNA, os sítios que já analisavam esses dados previamente à construção da rede empregaram distintos procedimentos, incluindo métodos mais artesanais (utilizando SDS, CTAB, Fenol-clorofórmio, etc) ou por meio de kits de extração produzidos por distintas empresas. Isto inviabilizou encontrar um critério comum para este procedimento e se decidiu não estabelecer uma metodologia particular. Em todo caso, o presente livro inclui uma das metodologias mais utilizadas para que se tenha um método como por padrão a ser sugerido para futuros novos observatórios.

Toda esta informação foi compilada em um documento compartilhado entre os grupos dos Observatórios para que as amostragens Piloto da Rede pudessem ter início. Estes protocolos padronizados que permitiram o levantamento vantagens e dificuldades de cada grupo neste período inicial que foram discutidos na segunda reunião da Rede, empreendida em novembro de 2019. O segundo encontro do  $\mu$ SudAqua, realizado em Chascomús (Buenos Aires, Argentina) deu lugar à segunda reunião da Rede de Observatórios Microbianos da América Latina. Lá foram apresentados os resultados preliminares, e deu-se prosseguimento na discussão sobre os avanços e dificuldades de cada grupo da Rede e no estabelecimento de novas metas. Até esta reunião, a Rede incluía observatórios localizados em Costa Rica, Brasil, Uruguai e Argentina, cujas comunidades microbianas e principais características limnológicas vinham sendo monitoradas ao menos bimistralmente. A Rede contava, então, com 8 sítios de monitoramento (período 2019-2020) sendo: 4 lagos, 2 rios, 1 estuário e 1 sítio marinho. Pelo discutido nesta reunião, e dada a impossibilidade de unificar todos os protocolos, o objetivo inicial da Rede de Observatórios foi modificada, consensuando-se manter os documentos com os protocolos mais comuns utilizados. Neste documento, os procedimentos para a maioria dos parâmetros se encontram unificados, equanto alguns possuem mais de uma opção metodológica, dependendo do tipo de ambiente analisado, enquanto outros se mantêm um critério de cada sítio (p. ex.: amostragem de DNA ambiental). Além disso, considerando as dúvidas metodológicas suscitadas por alguns dos procedimentos, foram gravados e incluídos ao documento vídeos explicativos destas metodologias mais complicadas.

No ano de 2020, como consequência da pandemia do COVID-19, a maioria dos sítios teve suas amostragens pausadas por um período de um ano e meio. Neste

*período foi realizada uma reunião virtual da Rede em outubro de 2021, em que foi decidida a retomada das amostragens síncronas em todos os sítios, com início para Abril de 2022, e foi proposta a incorporação de novos Observatórios neste mesmo período. Atualmente, a Rede conta com 13 Observatórios ativos nos seguintes ambientes: 3 lagos, 4 rios, 2 estuários e 4 sítios marinhos (<https://microsudaqua.netlify.app/>).*

*Apresentamos aqui o livro de Protocolos Normalizados da Rede de Observatórios da América Latina, como um guia consensuado na Reunião do ano de 2019 em Chascomús, e que utilizamos atualmente em todos os Observatórios para a realização das amostragens.*

*Dezembro de 2023*

## **Participantes da Rede de Observatórios Microbianos (2017-2023)**

### **Argentina**

Allen Dohle, Sharon - INIBIOMA (UNComahue-CONICET)

Baliña, Sofía - IEGEBA (CONICET-UBA)

Barrena, Maité - CIMAS-CONICET

Bastidas Navarro, Marcela - INIBIOMA (UNComahue-CONICET)

Bernal, María Carolina - IEGEBA (CONICET-UBA)

Burgueño, Giuliana; CIMAS-CONICET, ESCiMar, UNCo

Cetra, Nicolás; CIMAS-CONICET, ESCiMar, UNCo

Fermani, Paulina - IBIOMAR-CONICET

García, Patricia - INIBIOMA (UNComahue-CONICET)

Gerea, Marina - INIBIOMA (UNComahue-CONICET)

Gómez, Bárbara - Instituto Nacional del Agua (INA)

Gómez Lugo, Sebastián - IEGEBA (CONICET-UBA)

Graziano, Martín - IEGEBA (CONICET-UBA)

Huber, Paula - INALI - CONICET

Hünicken, Leandro - CIMAS (CONICET-UNS)

Izaguirre, Irina - IEGEBA (CONICET-UBA)

Lagomarsino, Leonardo - INTECH (CONICET-UNSAM)

Latorre, Maite - CADIC-CONICET

Lozada, Mariana - IBIOMAR-CONICET

Malits, Andrea - CADIC-CONICET

Mansilla Ferro, Carolina - INIBIOMA (UNComahue-CONICET)

Martyniuk, Nicolás - INIBIOMA (UNComahue-CONICET)

Miranda, Cecilia - IMIBIO - Gobierno de Misiones

Ojeda, Damian - INEDES (UNLu-CONICET-CIC)  
O' Farrel, Inés - IECEBA (CONICET-UBA)  
Padulles, María Luz - INEDES (UNLu-CONICET-CIC)  
Porcel, María Sol - IECEBA (CONICET-UBA)  
Quiroga, María Victoria - INTECH (CONICET-UNSAM)  
Saad, Juan - CIMAS-CONICET, ESCiMar, UNCo  
Sabio y García, Carmen - Universidad de Buenos Aires (UBA)  
Salas, Cecilia - CIMAS-CONICET  
Sánchez, María Laura - IECEBA (CONICET-UBA)  
Santucho, Gladys Janet - INTECH (CONICET-UNSAM)  
Saraceno, Martín - IECEBA (CONICET-UBA)  
Schiaffino, Romina - CIT NOBA (CONICET-UNNOBA)  
Soto Cárdenas, Carolina - INTECH (CONICET-UNSAM)  
Torremorell, Ana - INEDES (UNLu-CONICET-CIC)  
Unrein, Fernando - INTECH (CONICET-UNSAM)

### **Brasil**

Araujo-Paina Karime - Universidade Federal de São Carlos  
Arboleda-Baena, Clara María - Universidade Federal de São Carlos  
Cassiano-Oliveira, Israel - Universidade Federal de São Carlos  
Costa, Mariana - Universidade Federal do Rio Grande do Norte  
de Melo, Michaela - Université du Québec à Montréal  
Espolau, Greyce - Universidade Federal de São Carlos  
Guido-Giongo, Daniel - Universidade Federal de São Carlos  
Hummer, Eloisa - Universidade Federal de São Carlos  
Junger, Pedro - Universidade Federal de São Carlos



Lacativa Bagatini, Inessa - Universidade Federal de São Carlos

Perbiche Neves, Gilmar - Universidade Federal de São Carlos

Mateus-Barros, Erick - Universidade Federal de São Carlos

Sarmiento, Hugo - Universidade Federal de São Carlos

### **Costa Rica**

Gómez Eddy - Universidad de Costa Rica

### **Uruguai**

Alonso, Cecilia - CURE-UdelaR

González, Belén - CURE-UdelaR

Griffero, Luciana - CURE-UdelaR

Zanetti, Juan - CURE-UdelaR

### **Protocolos**

Protocolo de Clorofila-a: Romina Schaffino y Maria Laura Sánchez

Protocolo de Fitoplancton cuantitativo: María Laura Sánchez y Romina Schiaffino

Protocolo de Citometría: Fernando Unrein y Andrea Malitz

Protocolos de Nutrientes Disueltos: Martín Graziano, Leonardo Lagomarsino

Protocolo de Nutrientes Totales: María Luz Padulles y Eddy Gómez

Protocolo de ADN ambiental: Carmen Sabio y García, Luciana Griffero, Paulina Fermani

Protocolo de Materia orgánica disuelta y Carbono orgánico disuelto: Marina Gereá

# Índice

<b>Indicações gerais para realizar as coletas</b> .....	1
<b>Seção 1: Preparação de material para coleta</b> .....	3
1.1 Clorofila-a e Nutrientes.....	4
1.2 Fitoplâncton quantitativo.....	4
1.3 Citometria.....	5
1.4 DNA ambiental.....	7
1.5 Carbono Orgânico Dissolvido (DOC) e Matéria Orgânica Dissolvida (MOD).....	7
<b>Seção 2: Material para levar ao campo e protocolo de amostragem</b> .....	9
2.1 Medições no campo.....	10
2.2. Clorofila-a e Nutrientes dissolvidos.....	10
2.3 Fitoplâncton quantitativo .....	10
2.4 Citometria.....	11
2.5 DNA ambiental.....	12
2.6 Carbono Orgânico Dissolvido (DOC) e Matéria Orgânica Dissolvida (MOD).....	13
<b>Seção 3: Protocolo de análise em laboratório</b> .....	14
3.1 Turbidez.....	15
3.2 Clorofila-a y Nutrientes.....	15
3.2.1 Determinação de Clorofila-a.....	16
3.2.2 Nutrientes dissolvidos.....	19
3.3 Fitoplâncton quantitativo.....	19

3.4 Citometria.....	20
3.4.1 Bactérias heterótrofas.....	21
3.4.2 Picoplâncton autotrófico.....	21
3.4.3 Nanofitoplâncton autotrófico.....	21
3.5 DNA ambiental.....	22
3.5.1 Procedimento de extração de DNA ambiental.....	22
3.6 Carbono Orgânico Dissolvido (DOC) e Matéria Orgânica Dissolvida (MOD).....	25
3.6.1 Carbono orgânico dissolvido (COD).....	25
3.6.2 Matéria orgânica dissolvida (MOD).....	26
<b>Seção 4: Bibliografia.....</b>	<b>28</b>
<b>Seção 5: Epílogo.....</b>	<b>29</b>

---

## ***Indicações gerais para realização das coletas***

Esta seção indica como as coletas serão realizadas, com que frequência, lugar do corpo d'água e quais parâmetros devem ser medidos.

### **Coletas:**

- ✓ Coleta bimestral (preferentemente mensal)
- ✓ Coletas matutinas, durante a segunda quinzena dos meses pares (fevereiro, abril, junho, agosto, outubro, dezembro), na zona fótica do corpo d'água
- ✓ Forma de identificar as amostras: **DUAS LETRAS PARA SÍTIO\_aammdd**

### **Parâmetros a medir:**

#### **1) Clorofila-a (Chl-a)**

#### **2) Nutrientes:**

- Nutrientes totais ---> Fósforo total (FT), nitrogênio total (NT)
- Nutrientes dissolvidos ---> Amônio ( $\text{NH}_4^+$ ), nitratos ( $\text{NO}_3^-$ ), fosfatos ( $\text{PO}_4^+$ )

#### **3) Fitoplâncton quantitativo**

#### **4) Citometria**

- Bactérias heterótrofas
- Picoplâncton e nanoplâncton autotrófico

## **5) DNA ambiental**

- Procariotos

## **6) Matéria Orgânica Dissolvida (MOD) e Carbono Orgânico Dissolvido (COD)**

---

1.

## ***Preparação de material para coleta***

Os materiais para a coleta estão resumidos na lista a seguir:

- ✓ Frascos plásticos de 250 ou 500 ml (para medição de nutrientes totais, nutrientes dissolvidos/Clorofila-a, fitoplâncton, DNA ambiental, COD/MOD);
- ✓ HCl 10%;
- ✓ H<sub>2</sub>O destilada ou ultrapura;
- ✓ Solução de Lugol acidificado (1%) (fitoplâncton);
- ✓ Criovials estéreis de 5 ou 4,5 ml com fixador a definir para cada corpo de água (para análises de procariotos, picoeucariotos e nanoplâncton por citometria);
- ✓ Caixas para guardar criovials (citometria);
- ✓ Garrafa térmica de N<sub>2</sub> líquido (citometria);
- ✓ Pipetas automáticas e ponteiras;
- ✓ Garrafa Niskin ou Van Dorn (dependendo do local);
- ✓ Rede de 50  $\mu$ m

As particularidades de cada parâmetro a se medir estão detalhadas nos parágrafos adiante.

## 1.1 Clorofila-a e Nutrientes

Nutrientes totais: lavar frascos plásticos de 250 ou 500 ml com HCl 10%. Em seguida, enxaguar pelo menos 3 vezes com água destilada ou ultrapura.

Clorofila-a e nutrientes dissolvidos: lavar frascos plásticos com HCl 10%. Em seguida, enxaguar pelo menos 3 vezes com água destilada ou ultrapura. Pode ser utilizado o mesmo frasco para ambas medições. O tamanho do frasco dependerá do volume que será necessário filtrar para a determinação da concentração de clorofila-a.

## 1.2 Fitoplâncton quantitativo

Lavar uma garrafa/frasco de 200 - 500 ml com água destilada e preparar o Lugol acidificado.

- Preparação de Lugol acidificado:
  - Preparar 200 ml de Lugol 13,6% (30 gramas de soluto em 220 ml de solução = 13,6% m/v):
  - 20 g IK + 10 g I2 em 200 ml de água destilada (utilizar um agitador magnético para ser mais rápido) + 10% de ácido acético glacial (20 ml).

Nota 1: Caso o Lugol já esteja preparado, adicionar apenas 10% de ácido acético glacial.

Nota 2: A solução de Lugol acidificada deve ser armazenada na geladeira (4°C) e em frasco revestido com papel alumínio para permanecer em local escuro.

### 1.3 Citometria

Os materiais necessários para preparar as amostras de citometria dependem do fixador a ser utilizado (P+G, Glutaraldeído ou GlyTE) e do tipo de organismos a ser preservado (bactérias, picoautotróficos e nanoplâncton). Abaixo estão detalhados os materiais para preparar as amostras de citometria:

- Bactérias, picoautotróficos e nanoplâncton
  - Rotular frascos criogênicos de 4,5 ml previamente aliquotados com 400  $\mu$ l do fixador utilizado pelo laboratório

As preparações dos fixadores são detalhadas a seguir, de acordo com o tipo de organismo a ser preservado e o local de coleta.

- Preparação de 1 litro de P+G (1% Paraformaldeído + 0,05% Guataraldeído Final):
  - Trabalhe sob uma coifa de extração;
  - Aqueça 800 mL de 1X PBS a 60°C e mantenha a essa temperatura com um agitador magnético;
  - Adicione 100 g de paraformaldeído;
  - Adicione os grânulos de NaOH um de cada vez e continue mexendo até que a solução fique límpida (deve demorar 1-5 min);
  - Retire do calor;
  - Adicione 20 ml de Glutaraldeído 25%;
  - Ajuste ao pH = 7,2 com HCl;
  - Completar para 1 litro com 1X PBS;
  - Filtrar através de um filtro de policarbonato de 0,22  $\mu$ m;
  - Alíquota de 400  $\mu$ l em cada frasco criogênico;
  - Conservar no congelador a -20°C (melhor a -80°C)



Nota: uma vez descongelado deve guardar a 4°C e usar dentro de uma semana ou descartar!

- Preparação de glutaraldeído:

- O glutaraldeído a 25% é pré-filtrado através de 0,22  $\mu\text{m}$  e armazenado em geladeira (4°C).

- Preparação de GlyTE:

- Prepare 100 ml de solução de EDTA 0,5 M:

- Coloque 18,6 g de EDTA + 80 ml de água ultrapura (Enquanto mistura com o agitador magnético, ajuste o pH = 8 adicionando lentamente NaOH).

- Adicione água ultrapura a um volume final de 100 mL.

- Filtrar através de 0,22  $\mu\text{m}$ .

- Prepare 100X TE (1 M Tris; 100 mM EDTA):

- Coloque 12,1 g de TRIS + 20 ml de 0,5 M EDTA (previamente preparado)

- Adicione água ultrapura até 80 mL (Enquanto mistura com agitador magnético, ajuste o pH = 8 adicionando lentamente HCl a 37%).

- Adicione água ultrapura a um volume final de 100 mL.

- Filtrar através de 0,22  $\mu\text{m}$ .

- Preparação do estoque GlyTE:

- Misturar:

- 20 ml 100x TE pH 8,0

- 60ml de água ultrapura

- 100 ml de glicerol de grau molecular (use seringa)
- Após a mistura, passe o GlyTE por um filtro de 0,22  $\mu\text{m}$  e armazene refrigerado (4°C).
- Refiltre antes de usar.

Nota: autoclavar os restantes 0,5M EDTA e 100X TE para armazenar (próxima preparação de GlyTE).

#### 1.4 DNA ambiental

Lave as garrafas plásticas de 250, 500 ml ou um tamanho maior (se necessário) com HCl 10% (1 vez). Em seguida, lave 2 vezes com água destilada e finalize com 1 lavagem com ultrapura/H<sub>2</sub>O destilado. O tamanho da garrafa dependerá do volume que será posteriormente filtrado.

Lave um aparato de filtração da mesma forma que as garrafas, para uso no laboratório.

Nota: Em geral, são filtrados entre 100 e 300 ml de amostra. Em lagoas hipereutróficas como Chascomús, são filtrados entre 30 e 50 ml. No mar, são filtrados entre 1 e 4 litros.

#### 1.5 Carbono Orgânico Dissolvido (DOC) e Matéria Orgânica Dissolvida (MOD)

Lavar um frasco de polipropileno (plástico) 1 vez com HCl 10% e pelo menos 3 vezes com água destilada ou ultrapura para levar ao campo e coletar novamente amostras de água.

Lavar um aparato de filtração de vidro com HCl 10% e muflar a 440°C durante pelo menos 1 hora. Também muflar (a 440°C durante pelo menos 1 hora) frascos âmbar de 100mL, um para cada parâmetro analisado (DOC e MOD). Ambos serão usados no laboratório, logo após a coleta.

---

## 2.

### ***Material para levar a campo e protocolo de coleta***

Abaixo estão listados os materiais necessários para levar a campo:

- Planilha de campo;
- pHmetro;
- Condutivímetro;
- Oxímetro;
- Disco de Secchi;
- Garrafa Niskin ou Van Dorn (dependendo do local);
- Pipeta e ponteira;
- Material para etiquetagem;
- Rede de 50  $\mu\text{m}$  ou similar;
- Geladeira, gelo e/ou bolsa térmica;
- N<sub>2</sub> líquido (para citometria);
- Frascos plásticos de 250 ou 500 ml previamente lavados (nutrientes totais, nutrientes dissolvidos/Clorofila-a, fitoplâncton, DNA ambiental, COD/MOD);
- Lugol acidificado e pipeta pasteur de plástico (fitoplâncton);
- Criotubos de 4,5 mL com P+G (citometria): bactérias, picoplâncton autotrófico e nanoplâncton;

- Criotubos de 4,5 mL com GlyTE (citometria): bactérias, picoplâncton autotrófico e nanoplâncton;

Os procedimentos de cada parâmetro a se medido estão detalhados nos parágrafos adiante.

## **2.1 Medições no campo**

Tomar medidas de temperatura da água, pH, condutividade e oxigênio dissolvido; seguindo as indicações do equipamento a utilizar.

Identificar variáveis relevantes para os distintos ambientes. Por exemplo, em riachos podem ser medidos largura, profundidade vazão, tipo de vegetação circundante, etc. Em lagos e mar, transparência utilizando disco de Secchi, vegetação circundante, profundidade, etc.

## **2.2 Clorofila-a e Nutrientes**

Clorofila-a e Nutrientes dissolvidos: re-colatar as amostras em frascos plásticos previamente lavados (sem filtrar). Se distante do laboratório, transportar as amostras em local frio (4°C) e ao abrigo da luz.

Nutrientes totais: re-coletar a amostra em frascos plásticos de 250 ou 500 ml previamente lavados (sem filtrar). Se distante do laboratório, transportar as amostras em local frio (4°C) e ao abrigo da luz.

## **2.3 Fitoplâncton quantitativo**

Coletar entre 200 e 500 ml (dependendo do local do estudo) de água subsuperficial não filtrada e armazenar em uma garrafa/frasco previamente lavado. Fixar a amostra

com Lugol acidificado a 1% (concentração final). Armazenar em local seco e abrigado da luz.

Nota 1 Periodicamente verificar o estado das amostras e adicionar mais Lugol, caso seja necessário.

Nota 2 Caso não seja possível fixar a amostra em campo, manter os frascos abrigados da luz e em local fresco.

## **2.4 Citometria**

Tomar amostras de água e pré-filtrar com rede de 50  $\mu\text{m}$  para retirada de zooplâncton.

Adicionar amostra nos cryovials, contendo distintos fixadores a depender do tipo de organismo que será contado e características físico-químicas de cada sítio:

- Bactérias, picoautótrofos e nanoplâncton: Se utilizando um frasco de 4.5ml, adicionar 4 ml de amostra e completar com 400  $\mu\text{l}$  do conservante ou fixador escolhido (Glyte, P+G ou formol).

Homogeneizar cada amostra por inversão delicada e manter em local protegido da luz por 10 minutos. Em seguida, submergir as amostras em nitrogênio líquido até seu congelamento e armazenar em freezer  $-80^{\circ}\text{C}$  dentro de sua respectiva caixa (se não for possível, guardar a  $-20^{\circ}\text{C}$ ).

Nota: Há um [vídeo disponível na pasta compartilhada](#) sobre o processamento destas amostras para sua conservação.

### **Considerações para a preservação correta das amostras de citometria:**

- O **congelamento** é uma etapa chave para a preservação da amostra. um congelamento imediato evita que células se quebrem e lixo seja acumulado, o que prejudica a etapa de leitura no equipamento. Portanto, as amostras precisam ser fixadas **o mais rápido possível e no nitrogênio líquido!**
- Evitar que fixadores que são preservados em geladeira ou freezer fiquem descongelados e à temperatura ambiente por muito tempo, em especial para o P+G.
- Idealmente, levar o nitrogênio líquido ao sítio de coleta e fixar a amostra in situ. Se não for possível, levar a amostra em local frio (4°C) e ao abrigo de luz até o laboratório e fixar o mais rápido possível.
- O P+G, uma vez descongelado, deve ser utilizado imediatamente. Após o uso, é possível guardar o excedente a 4°C por uma semana no máximo. Não pode voltar a ser congelado nem mantido em temperatura ambiente por muito tempo, por alterar a eficiência de sua fixação.
- **A amostra não deve ser descongelada até que seja medida.** O transporte de amostras já fixadas deve ser feito com estas congeladas!

### **2.5 DNA ambiental**

Enxaguar as garrafas previamente lavadas 2 vezes com a água do local antes de recolher a amostra. Recomenda-se, especialmente nos locais mais impactados, pré-filtrar com um filtro de 50  $\mu\text{m}$ . Transportar a amostra sob refrigeração até o laboratório (4°C).

## **2.6 Carbono Orgânico Dissolvido (COD) y Matéria Orgânica Dissolvida (MOD)**

Coletar 250 ml de água no frasco plástico previamente lavado (esse volume é suficiente para as duas análises). Transportar as amostras ao abrigo da luz e em temperatura ambiente ou sob refrigeração.



---

### 3.

#### ***Protocolo de análises em laboratório***

Abaixo estão listados os materiais necessários para serem utilizados no laboratório após a extração das amostras de campo:

- HCl 10%;
- H<sub>2</sub>O destilada e/ou ultrapura;
- Sistema de filtração (Nutrientes dissolvidos/Clorofila-a e DNA);
- Reagentes, tipo Hach (Nutrientes);
- Filtros tipo Whatman GF/F, com tamanho 0.7  $\mu\text{m}$  e muflados a 450° C durante ao menos 4 horas (Nutrientes dissolvidos/Clorofila-a);
- Papel alumínio (Clorofila-a);
- Sistema de filtração de vidro lavado com ácido e muflados a 440°C durante ao menos 1 hora (COD e MOD);
- Filtros de policarbonato com poro de 0.22  $\mu\text{m}$  (tipo Millipore GTTP04700) (DNA);
- Filtros com poro de 3  $\mu\text{m}$  (opcional DNA);
- Filtros de fluoreto de polivinilideno (PVDF) ou Membrana GV (Millipore - GVWP04700) com poro de 0.22  $\mu\text{m}$  (COD e MOD);
- Frasco âmbar de 100 mL muflado a 440°C durante ao menos 1 hora (COD e MOD);

- Turbidímetro (caso disponha);
- Espectrofotômetro UV.

Os procedimentos que devem ser realizados para cada parâmetro estão detalhados nos parágrafos adiante.

### **3.1 Turbidez**

- Separar um volume para medição de turbidez, caso possua turbidímetro.

Nota: Caso não tenha o turbidímetro, é possível realizar a determinação de sólidos em suspensão a partir de protocolos APHA.

### **3.2 Clorofila-a e Nutrientes**

#### **Nutrientes totais:**

- Após a coleta, as amostras deverão ser armazenados a  $-20^{\circ}\text{C}$  até a sua análise.
- A análise será feita pelos métodos APHA ou EPA. Para a água do mar, recomendamos seguir os métodos de Strickland-Parsons (1972).

#### **Clorofila-a e Nutrientes dissolvidos:**

- Filtrar um determinado volume de amostra utilizando o filtro Whatman GF/F de  $0.7\ \mu\text{m}$  até o filtro entupir. O volume a ser filtrado dependerá da quantidade de material em suspensão, portanto, em ambientes eutróficos, será utilizado um

volume pequeno (~50-150 ml), enquanto em ambientes oligotróficos ou marinhos entre 1000 e 2000 mL.

- Anotar o volume filtrado.
- Coloque o filtro (dobrado ao meio com a parte filtrada sobre si) em um pequeno pacote de papel alumínio etiquetado (data, nome do corpo d'água, mililitros filtrados e número de filtros).
- Armazenar os filtros em freezer a  $-20^{\circ}\text{C}$  para facilitar a ruptura das paredes celulares e a liberação do pigmento. Os filtros podem ser armazenados por no máximo 3 semanas.

Nota 1. O filtro será utilizado para a determinação da Clorofila-a.

Nota 2. O filtrado será utilizado para a determinação de Nutrientes dissolvidos.

### **3.2.1 Determinação de Clorofila-a:**

- Cortar os filtros em pequenos pedaços e colocar em frascos de plástico revestidos com papel alumínio.
- Adicionar 8 ml de etanol (pelo menos 80%), quente (entre  $60^{\circ}\text{C}$  e  $70^{\circ}\text{C}$ ). Este será o solvente da extração. Em caso de utilizar 2 filtros para uma mesma amostra, utilizar 12 mL de etanol.
- Agitar vigorosamente para garantir que todos os pedaços de filtro estão mergulhados no etanol.
- Anotar o volume do solvente adicionado.
- Deixar em repouso ao abrigo da luz em uma geladeira ( $4^{\circ}\text{C}$ ) para facilitar a extração dos pigmentos fotossintéticos.

Nota: Este passo pode ser realizado alguns dias depois da filtração e acondicionamento da amostra em  $-20^{\circ}\text{C}$ , mas se recomenda não demorar mais do que 3 semanas após a coleta.

No dia seguinte à extração:

- Centrifugar a amostra por uns 10 minutos
- Ler absorbância a 665 e 750 nm em espectrofotômetro, realizando um branco previamente com etanol puro.
- Na mesma cuveta, adicionar 1 gota de HCl 1M e após 1 minuto ler a absorbância novamente nos dois comprimentos de onda. Não exceda a quantidade de HCl, pois alguns pigmentos acessórios podem alterar sua absorbância para a de feofitina-a e interferir na determinação.

Fórmula para o cálculo da concentração de Clorofila-a:

$$[\text{Clorofila-a sem feopigmentos}] = F \cdot [(Abs_{1665} - Abs_{1750}) - (Abs_{2665} - Abs_{2750})] \cdot k \cdot v$$

onde **[Clorofila-a sem feopigmentos]** é expressa em  $\mu\text{g}$  por litro; **Abs1** representa a absorbância antes de acidificar; **Abs2** representa a absorbância depois de acidificar; **F** é um fator de correção para equiparar a redução na absorbância com a Clorofila-a inicial (2.43 para etanol, 2.72 para metanol e 2.43 para acetona); **k** é o coeficiente de absorção específica (11.2 para etanol, 11.62 para metanol e 10.48 para acetona); **v** é o volume do extrato de pigmentos, em ml / (volume da amostra em litros x espessura da cuveta em cm).

Considerações:

- ✓ Utilizar Etanol absoluto para a análise.
- ✓ Utilizar as cuvetas exclusivas para clorofila. Lavar com detergente EXTRAN e em seguida com etanol.
- ✓ Calibrar com etanol puro a 665 nm e a 750 nm para o branco.
- ✓ Calibrar novamente a cada 4 amostras para comprovar a calibração
- ✓ Lavar as cuvetas com etanol entre cada amostra.

- Extração com acetona para água marinha/salgada:

- Seguir os mesmos passos detalhados no protocolo anterior, mas ao invés de utilizar etanol absoluto quente, utilizar acetona (sem aquecer) como solvente de extração para fitoplâncton marinho.

Considerações:

- ✓ Utilizar Acetona 90% para a análise.
- ✓ Separar cuvetas para utilizar apenas para clorofila. Lavar com detergente EXTRAN e em seguida com acetona.
- ✓ Calibrar com acetona pura a 665 nm e a 750 nm para o branco.
- ✓ Calibrar novamente a cada 4 amostras para verificar a calibração
- ✓ Lavar as cuvetas com acetona entre cada amostra.

- Extração com metanol para água doce:

Como alternativa ao uso de etanol quente, pode-se utilizar metanol como solvente de extração. Os passos são os mesmos detalhados no protocolo com etanol absoluto. **Atenção:** se o grupo de trabalho pretende utilizar este solvente, é preciso realizar uma inter-calibração prévia para verificar a capacidade de extração de ambos solventes.

### 3.2.2 Nutrientes dissolvidos:

- Recomenda-se realizar a determinação no próprio dia ou nos dias seguintes.
- Caso a dosagem do nutriente não seja realizada no mesmo dia, o filtrado é armazenado a  $-20^{\circ}\text{C}$  até a sua determinação.

Nota: a determinação de cada um dos parâmetros será realizada pelos métodos APHA ou EPA. Recomendamos: Método do Salicilato de Amônio (Método EPA 350.1) - Método do Fenato Alternativo, APHA 4500-NH<sub>3</sub>-F; Nitratos: método de redução de cádmio, APHA 4500-NO<sub>3</sub>-E; Ortofosfato: método de vanadato-molibdato, APHA 4500-P-C - método de ácido ascórbico, APHA 4500-P-E. Para a água do mar, recomendamos seguir os métodos de Strickland-Parsons (1972).

### 3.3 Fitoplâncton quantitativo

- Conservar a amostra sob refrigeração ( $4^{\circ}\text{C}$ ) e ao abrigo da luz, até sua posterior quantificação por microscópio invertido.

Nota: A fixação com Lugol exige o monitoramento periódico da cor das amostras armazenadas, a fim de repor o Lugol perdido devido à

oxidação do lodo. Se as amostras estiverem descoloridas, adicione novamente uma gota de Lugol acidificado.

O fitoplâncton será quantificado pelo método de sedimentação de Utermöhl (1958) com o auxílio de um microscópio invertido. O volume sedimentado irá variar de acordo com cada local de coleta.

### **3.4 Citometria**

- Usando um citômetro de fluxo, as amostras extraídas e preservadas serão analisadas para bactérias heterotróficas (1), picoplâncton autotrófico (2) e nanofitoplâncton autotrófico (3).
- Como cada grupo tem acesso a diferentes tipos de citômetros, não é possível padronizar as configurações, porém alguns critérios de análise podem ser estabelecidos.

Em geral:

- O limite das configurações "sempre" deve ser definido como fluorescência "FL1 ou FITC" para coloração SybrGreen e "FL3 ou PerCP" para algas.
- Adicione beads Yellow-Green de 1  $\mu\text{m}$  para usar como referência de tamanho e fluorescência.
- Anote o volume de amostra e diluição, velocidade, voltagem, configurações e nome do arquivo.

#### **3.4.1 Bactérias heterótrofas:**

- As bactérias são coradas com SYBR GREEN I.

Preparação da solução de trabalho de SYBR GREEN I:

- A solução de trabalho de SYBR GREEN I é preparada com uma diluição 1:100 do da solução-estoque comercial (10.000X) em DMSO.
- Para analisar a amostra em citômetro, 100  $\mu$ l de amostra são corados com 1  $\mu$ l da solução de trabalho (1X concentração final).
- Incubar em temperatura ambiente por 10 minutos ao abrigo da luz antes de passar a amostra no citômetro.
- As bactérias são analisadas tipicamente em dois bi-plots: FL1 x SSC e FL3 x FL1

#### **3.4.2 Picoplâncton autotrófico:**

- As amostras são analisadas no citômetro sem corar.
- São utilizados tipicamente os gráficos: FL3 x SSC, FL3 x FL2 e FL3 x FL4. Os dois últimos vão depender se as picocianobactérias presentes nas amostras são ricas em ficoeritrina (FL2) ou em ficocianina (FL4).

#### **3.4.3 Nanofitoplâncton autotrófico:**

- Utiliza-se a mesma amostra e os mesmos gráficos indicados para o picoplâncton autotrófico, apenas modificando as configurações (reduzindo a voltagem de operação), de modo de posicionar os picoeucariotos abaixo e à esquerda, de forma que se visualice melhor toda a população de nanofitoplâncton.

### **3.5 DNA ambiental**



- Filtrar a água coletada em filtros de 0,22  $\mu\text{m}$ . Para amostras de água doce, de 100 a 300 mL; para amostras marinhas, de 1 a 4 L. Para isso, utilize um aparato de filtração previamente lavado.
- Conservar os filtros em um criotubo ou eppendorf estéril, sem buffer, a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

Nota 1: em locais altamente impactados, recomenda-se realizar uma pré-filtração por 3  $\mu\text{m}$  antes da filtração por 0,22  $\mu\text{m}$ , a fim de evitar o entupimento do último filtro com partículas suspensas.

Nota 2: tutorial em vídeo disponível na pasta compartilhada sobre o procedimento de filtração:

<https://drive.google.com/file/d/1h7XTJY8vcSX59xdISlInn6uTr6JpcbAK/view?usp=sharing>

### **3.5.1 Procedimento de extração de DNA ambiental**

*A rede não tem um procedimento padronizado para extração de DNA e cada local usa seus próprios protocolos. Como orientação, aqui estão duas referências para um procedimento de extração usando um método caseiro (que é usado por vários locais) e outro usando um kit de extração.*

*a- Protocolo de extração com tampão CTAB: Fernández Zenoff et al. (2006)*

*b- Protocolo com kit de extração: Lozada et al. (2022).*

**a-Protocolo CTAB (Modificado de Fernández Zenoff et al. (2006))**

*CTAB seguido de extração com uma solução de clorofórmio e álcool isoamílico:*

- *Realizar uma solução tampão de lise CTAB (Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide) (2% CTAB; 1.4M NaCl, 100 mM Tris-Cl pH 8, 20 mM EDTA pH 8). Essa solução é armazenada em temperatura ambiente. Ela é estável por vários anos. Antes do uso, adiciona-se  $\beta$ -mercaptoetanol a 0.2% (concentração final) e a solução é aquecida a 60°C.*
- *Aliquotar essa solução de CTAB em eppendorfs de 2 mL e incorporar cada filtro.*
- *Incubar a 60 °C durante 30 minutos*
- *Logo, se realizam dois passos de purificação: adicionar 0,7 ml de clorofórmio-álcool isoamílico (24;1) e centrifugar a 14000 rpm por 10 minutos.*

*Nota 1: ao centrifugar, tenha o cuidado de orientar todos os tubos na mesma direção, pois não é possível observar a olho nu o pellet que será formado.*

- *Recuperar a fase aquosa em outro tubo de 1,5 mL (tendo cuidado de não eliminar os resíduos restantes)*
- *Em seguida, o DNA é precipitado em isopropanol frio*

*Nota 2: colocar em geladeira por pelo menos 15 minutos. Quanto mais tempo o material ficar na geladeira, maior será a precipitação. Considere deixar o material precipitar durante a noite.*

- *Centrifugar a 14000 rpm durante 10 minutos*

*Nota 3: ao centrifugar, tenha o cuidado de orientar todos os tubos na mesma direção, pois não é possível observar a olho nu o pellet que será formado*

- *Retirar o sobrenadante, evitando cuidadosamente o pellet*
- *Em seguida, serão necessárias etapas de lavagem. Para isso, adicione etanol 80% gelado*
- *Mesclar e centrifugar durante 2 minutos a 5000 rpm*

*Nota 4: para ambientes oligotróficos, aumentar o tempo para 7 minutos*

- *Repetir o passo de etanol a 80%*
- *Desprezar o sobrenadante, evitando o pellet*
- *Secagem e armazenamento*
  - *Deixe o pellet secar ao ar, com o eppendorf de cabeça para baixo para proteger o pellet, por 15 minutos.*

*Nota 5: se preferir, a secagem pode ser feita em um SpeedVac*

- *Ressuspender o pellet em 100 $\mu$ L de água ultrapura ou miliQ®*

*Nota 6: em ambientes oligotróficos, ressuspender em 50 $\mu$ L;*

*Nota 7: ao adicionar água, procurar lavar o lado onde está aderido o pellet*

- *Determinar a concentração de DNA em Nanodrop®, Picodrop® o Fluorómetro*
- *Diluir o DNA para 10 ng/ $\mu$ L usando água ultrapura o miliQ®*
- *Armazenar em congelador a -20°C.*

#### ***b- Utilizando kits de extracción***

*O DNA pode ser extraído com o Fast DNA Spin Kit (MP Biomedicals Inc., EUA), de acordo com as instruções do fabricante, e quantificado com fluorômetro ou Nanodrop®.*

*Para amostras marinhas, podem ser seguidos os procedimentos de Lozada et al. (2022).*

### **3.6 Carbono Orgânico Dissolvido (COD) e Matéria Orgânica Dissolvida (MOD)**

- Filtrar pelo menos 200 mL água através de filtros PVDF ou GF (0,22  $\mu\text{m}$ ) utilizando o aparato de filtração de vidro previamente lavado e muflado.

- Armazenar a amostra filtrada em dois frascos âmbar com tampa de teflon, previamente lavados e muflados - um para a medição de COD e o outro para a de MOD.

Nota: utilizar filtros de fluoreto de polivinilideno (PVDF) o membrana GV (Millipore - GVWPO4700) de 0,22  $\mu\text{m}$  de poro.

### 3.6.1 Carbono orgânico dissolvido (COD)

- Conservar a amostra a 4°C ao abrigo da luz.

*Nota: Se o ambiente amostrado apresenta grande quantidade de matéria orgânica (i.e.  $\text{DOC} \geq 10 \text{ mg/L}$ ), adicionar 3 gotas de HCl puro*

- Processar a amostra em um analisador de carbono que determine NPOC (non purgable organic carbon).

### 3.6.2 Matéria orgânica dissolvida (MOD)

Se possível, realizar a medição do espectro de absorção da amostra imediatamente após a filtração. Tenha a precaução de homogeneizar a temperatura da amostra e da água ultrapura que será usada como branco no espectrofotômetro.

- Submergir os frascos de amostras em um recipiente limpo com água ultrapura, em um banho térmico a 20°C durante meia hora antes de realizar a medição. Esse processo é importante para homogeneizar as temperaturas e assim evitar ruído ou variações irregulares no espectro entre 700 e 800 nm, faixa que será usada para corrigir a amostra.
- Uma vez que as amostras estejam a 20°C, ligue o espectrofotômetro e espere ao menos meia hora para aquecer as lâmpadas do equipamento.
- Para a medição, utilize uma cuveta de quartzo com comprimento do passo óptico adequado para o ambiente estudado (i.e. 1 cm, 5 cm ou 10 cm).
- Configurar o espectrofotômetro para fazer uma varredura do espectro de absorção entre 200 e 800 nm. Se possível, extrair as absorbâncias para trabalhar imediatamente após a filtração.

Nota: Para otimizar e homogeneizar os cálculos, o grupo GESAP (Bariloche) elaborou [uma planilha Excel com macros](#). Esta planilha executa automaticamente os passos a seguir.

- Após subtrair o espectro da água ultrapura, realizar uma correção da amostra. Para isso, deve-se obter a média das absorbâncias entre 700 e 800 nm e subtrair esse valor de cada uma das absorbâncias do espectro por completo.
- As unidades de absorbância (AU) deverão ser convertidas em coeficientes de absorção (Abs), de acordo com o modelo do espectrofotômetro, da seguinte maneira:

$$a = 2.303A/L$$

onde  $a$  é o coeficiente de absorção Napieriano ( $m^{-1}$ ),  $A$  é a absorbância e  $L$  é o comprimento do passo óptico da cuveta (em metros).

• Com os espectros corrigidos e convertidos, deverão ser calculados os índices:

○  $a_{254}$ ,  $a_{350}$  e  $a_{440}$

○  $S_{275-295}$  (declive espectral entre 275 e 295 nm) e  $S_R$  (slope ratio, razão do declive espectral)

○ SUVA 254 ( $a_{254}$ :DOC) e SUVA 350 ( $a_{350}$ :DOC)

• Para cada amostra, anote na [planilha fornecida pela GESAP](#):

○ Nome e as coordenadas geográficas do ponto de amostragem

○ Volume do filtrado

c- Filtro utilizado (PVDF, GV ou fibra de vidro),

d- Modelo do espectrofotómetro

e- Tipo de cuveta (comprimento do passo óptico em metros, e.g. 0,01m o 0,1m).

---

## 4.

### **Bibliografía**

- APHA (American Public Health Association) (1998). *Standard methods for the examination of water and wastewater*. En: Clescerl LS, Greenberg AE, Eaton AD (eds) Book 20. APHA, Washington, DC, p 4-487.
- Fernández Zenoff V., Siñeriz F. & Farías M.E. (2006). Diverse responses to UV-B radiation and repair mechanisms of bacteria isolated from high-altitude aquatic environments. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(12), 7857-7863. <https://doi.org/10.1128/AEM.01333-06>
- Lozada M., Zabala M.S., García P.E., Diéguez M.C., Bigatti G., Fermani P., Unrein F., Dionisi H.M. (2022). Microbial assemblages associated with the invasive kelp *Undaria pinnatifida* in Patagonian coastal waters: structure and alginolytic potential. *Sci. Total Environ.* 154629. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.154629>
- Strickland J.D.H., Parsons T.R. (1972). *A practical handbook of sea-water analysis*, 2nd edn. *J. Fish. Res. Board Can.* 167, 311.

---

## 5.

### **Epílogo**

*O trabalho em equipe e colaboração é imprescindível para levar a cabo este grande projeto. Sem dúvidas, o aporte de cada um de nós e a predisposição às reuniões virtuais e presenciais, são motores para persistir com entusiasmo as amostragens temporais e permitem planejar a projeção de longo prazo da Rede de Observatórios Microbianos. Aqui, apresentamos algumas fotos das reuniões, juntamente com a de alguns Observatórios Latinoamericanos.*



2017 - Grupo de Trabalho da Rede de Observatórios Microbianos (Uruguay)





2019 - Grupo de Trabajo da Rede de Observatórios Microbianos (Argentina)



2021 - Grupo de Trabalho da Rede de Observatórios Microbianos (virtual)



2022 - Grupo de Trabalho da Rede de Observatórios Microbianos (Brasil)



Foto representativa do sítio-observatório marinho  
Punta Este, Puerto Madryn, Chubut, Argentina (Foto: *Paulina Fermani*)



Foto representativa do sítio-observatório lótico de água doce  
Riacho São Francisco, Claypole, Prov. Buenos Aires, Argentina (Foto: *Martín Graziano*)



Foto representativa do sítio-observatório lêntico de água doce  
Laguna El Trébol, Bariloche, Prov. Río Negro, Argentina (Foto: Cristian D. Torres)



Foto representativa do sítio-observatório lêntico artificial de água doce  
Reservatório do Broa, Itirapina, São Paulo, Brasil (Foto: Erik Barros)

# MICROBIAL OBSERVATORY NETWORK

Protocols for standardization and water sampling in Latin America



**MICROSUDAQUA**

Red Colaborativa en Ecología Acuática Microbiana de América Latina

**Cover Photo: Dr. Cristian D. Torres**

# **Microbial Observatory Network**

*Protocols for standardization and water sampling in Latin America*

*Fermani Paulina, Gereá Marina, Graziano Martín, Mateus-Barros Erick, Sabio y  
García Carmen, Sánchez María Laura, Schiaffino Romina*

*Compilers*

*Gerea Marina and Bernal María Carolina*

*Translators*

*2023*

*First Edition*

## **Summary**

Anthropic impacts and climatic factors act jointly on ecosystems as forcing agents of change, often leading to their deterioration. The effect of these agents depends on geographic location, climate and vegetation, among other natural and anthropogenic factors that characterize the studied environment. In order to understand the impact of these factors over aquatic and terrestrial ecosystems it is important to have continuous, standardized and extended information over time.

Within aquatic ecosystems, microbial assemblages play a fundamental role in the cycles of matter and energy, and also have the potential to be robust indicators of the ecological and sanitary status of the ecosystem, due to their sensitivity and rapid response to environmental changes. In this sense, long term monitoring of microbial assemblages could provide valuable information on the characteristics of water bodies and the changes they undergo.

Considering these premises, in the framework of the first meeting of the collaborative network on microbial aquatic ecology in Latin America ( $\mu$ SudAqua), held in La Paloma (Rocha, Uruguay) in December 2017, the creation of a set of observatories was decided, whose main objective is to evaluate how anthropogenic impact and climatic factors, in a latitudinal gradient, influence the structure and dynamics of the microbial community at the continental level in the diversity of aquatic environments in the region. Thus, the Latin American Microbial Observatory Network was born.

Microbial observatories are valuable tools that have been established around the world in order to have access to systemized information on microscopic communities. However, they are scarce in Latin America. In this Observatory Network, observatory sites corresponding to different aquatic environments (freshwater, marine, lentic, lotic, with different types of anthropic impact) were selected based on their accessibility in order to achieve continuous sampling.

Likewise, the observatory sites chosen contemplate a minimum bimonthly (preferably monthly) and simultaneous frequency, in the surface layer of the water column (euphotic), and the measurement of simple parameters, using protocols agreed upon by its members, which facilitate long-term continuity and the possibility of making comparative analyses between the different sites.



This **book** aims to list the established and standardized protocols for sampling physicochemical parameters and biological communities in water, and subsequent analyses in the laboratory, taking into account the different water bodies.

The main objective of this network is to strengthen the collaborative links between research laboratories from different Latin American countries in order to enhance the capabilities and knowledge of each group. In this way, we intend to promote the exchange of knowledge to find collective answers to questions that concern us as a region.

## ***Preface***

***Fermani Paulina, Gereá Marina, Graziano Martín, Sabio y García Carmen, Schiaffino Romina***

Microbial observatories are a valuable tool to obtain systematized and organized information on microbial communities. Despite this, there are few observatories in Latin America that contemplate long-term studies, mainly due to the difficulty of maintaining the necessary infrastructure for this type of activity. In this sense, during the first meeting of the Aquatic Microbial Ecology Network ( $\mu$ SudAqua, <https://microsudaqua.netlify.app/>) held in December 2017 in Rocha (Uruguay), the need to create a Latin American Aquatic Microbial Observatory Network emerged. There, the long-term objectives for the Network were discussed and agreed upon. Thus, it was established as a general objective to form a set of observatories (sites) to evaluate how anthropogenic impact and climatic factors in a latitudinal gradient affect the structure and dynamics of the microbial community at the continental level in the diversity of aquatic environments in the region. We also hoped that this would allow us to generate a collective work among Latin American groups to strengthen regional and collaborative studies.

For the initial formation of the Latin American Aquatic Microbial Observatory Network, at the first meeting of the  $\mu$ SudAqua Network, eight observatory sites of different types of aquatic environments (freshwater, marine, lentic, lotic) throughout Latin America were proposed. In order to ensure the continuity of the sampling, the selection of sites strongly pondered the accessibility of the sites and that they should preferably be part of local projects that would help sustain the collection of samples. These sites were then re-evaluated based on the difficulties encountered during the Network's consolidation phase. Thus, the micro-observatory samplings contemplated a monthly frequency (possibly bimonthly, depending on site accessibility), in the surface layer of the water column (euphotic zone), and the measurement of simple parameters that facilitate long-term continuity. Subsequently, a survey of the proposed sites and the eventual incorporation of new observatories were carried out.

In order to address a global analysis of the parameters at each site, the common variables to be analyzed were discussed and defined during the first meeting in 2017. Once these parameters were established, a long process of protocol search for each parameter began which, within possibilities, could be used by all the observatories (rivers, streams, lakes, estuaries, etc.). Through surveys and virtual meetings, the equipment, techniques and protocols used by each site were evaluated and a consensus was reached on unified protocols for each of the proposed parameters. During this process, it became evident that the selected aquatic systems were very heterogeneous and the protocols that were useful for one type of system might not be useful for another system. For example, the Chlorophyll-a extraction efficiency with ethanol or acetone varies among environments (freshwater or marine). For this reason, it was defined to include both methods in this book. On the other hand, in the particular case of DNA extraction, sites that were already analyzing environmental DNA prior to the establishment of the network used different procedures (e.g. commercial kit or homemade technique; extraction with SDS and CTAB, etc.) and no common criterion was found to choose a single protocol, so it was decided not to establish a particular methodology. However, the present book includes one of the most widely used methodologies in current observatory sites for DNA extraction. All this information was compiled in a single document and shared with the observatory groups in order to initiate the Network's pilot sampling (April, 2019), with standardized protocols which allowed to reveal and discuss their advantages and difficulties during the initial period, in the second meeting of the observatory network. In November 2019, the second meeting of the  $\mu$ SudAqua was carried out in Chascomús (Buenos Aires, Argentina), where the second workshop of the microbial observatory network took place. There we shared the preliminary results of the first months of sampling of each observatory, and we moved forward in the discussion of different aspects of the network, sharing improvements and difficulties and establishing new goals. Until then, the Network included observatories located in Costa Rica, Brazil, Uruguay and Argentina, whose microbial communities and main limnological characteristics were monitored bimonthly. The observatory network included at that time eight different aquatic ecosystems (period 2019-2020): 4 lakes/lagoons, 2 rivers, 1 estuary and 1 marine site. Based on the discussion and due to

the impossibility of unifying the protocols among different aquatic sites, the main objective was redefined, and we decided to maintain a book of protocols that included only the most common techniques among the observatories. In this document, procedures for most of the parameters are unified, while in some cases more than one methodological option is present, depending on the type of environment analyzed (freshwater or marine) and others are left to the discretion of each group (e.g. environmental DNA). In addition, considering methodological uncertainties of some protocols, explanatory videos of some of the techniques were recorded and included in the document.

In 2020, as a consequence of the Covid-19 pandemic, most of the observatory sites interrupted the samplings for at least one and a half years. After a virtual meeting of the network in October 2021, we decided to re-start the synchronized sampling in April 2022, and we encouraged the incorporation of new observatory sites in the following stage. At present, the network includes 13 active observatory sites consisting of 3 lakes/lagoons, 4 rivers, 2 estuaries and 4 marine sites (<https://microsudaqua.netlify.app/>).

We presented the book of standardized protocols of the Observatory Network as a guide agreed upon at the 2019 meeting in Chascomús, which is currently used by all the observatory sites for sampling.

2023, December

## ***Microbial Observatory Network Participants (2017-2023)***

### **Argentina**

Allen Dohle, Sharon - INIBIOMA (UNComahue-CONICET)

Baliña, Sofía - IEGEBA (CONICET-UBA)

Barrena, Maité - CIMAS-CONICET

Bastidas Navarro, Marcela - INIBIOMA (UNComahue-CONICET)

Bernal, María Carolina - IEGEBA (CONICET-UBA)

Burgueño, Giuliana; CIMAS-CONICET, ESCiMar, UNCo

Cetra, Nicolás; CIMAS-CONICET, ESCiMar, UNCo

Fermani, Paulina - IBIOMAR-CONICET

García, Patricia - INIBIOMA (UNComahue-CONICET)

Gerea, Marina - INIBIOMA (UNComahue-CONICET)

Gómez, Bárbara - Instituto Nacional del Agua (INA)

Gómez Lugo, Sebastián - IEGEBA (CONICET-UBA)

Graziano, Martín - IEGEBA (CONICET-UBA)

Huber, Paula - INALI - CONICET

Hünicken, Leandro - CIMAS (CONICET-UNS)

Izaguirre, Irina - IEGEBA (CONICET-UBA)

Lagomarsino, Leonardo - INTECH (CONICET-UNSAM)

Latorre, Maite - CADIC-CONICET

Lozada, Mariana - IBIOMAR-CONICET

Malits, Andrea - CADIC-CONICET

Mansilla Ferro, Carolina - INIBIOMA (UNComahue-CONICET)

Martyniuk, Nicolás - INIBIOMA (UNComahue-CONICET)

Miranda, Cecilia - IMIBIO - Gobierno de Misiones

Ojeda, Damian - INEDES (UNLu-CONICET-CIC)

O' Farrel, Inés - IEGEBA (CONICET-UBA)  
Padulles, María Luz - INEDES (UNLu-CONICET-CIC)  
Porcel, María Sol - IEGEBA (CONICET-UBA)  
Quiroga, María Victoria - INTECH (CONICET-UNSAM)  
Saad, Juan - CIMAS-CONICET, ESCiMar, UNCo  
Sabio y García, Carmen - Universidad de Buenos Aires (UBA)  
Salas, Cecilia - CIMAS-CONICET  
Sánchez, María Laura - IEGEBA (CONICET-UBA)  
Santucho, Gladys Janet - INTECH (CONICET-UNSAM)  
Saraceno, Martín - IEGEBA (CONICET-UBA)  
Schiaffino, Romina - CIT NOBA (CONICET-UNNOBA)  
Soto Cárdenas, Carolina - INTECH (CONICET-UNSAM)  
Torremorell, Ana - INEDES (UNLu-CONICET-CIC)  
Unrein, Fernando - INTECH (CONICET-UNSAM)

## **Brazil**

Araujo-Paina Karime - Universidade Federal de São Carlos  
Arboleda-Baena, Clara María - Universidade Federal de São Carlos  
Cassiano-Oliveira, Israel - Universidade Federal de São Carlos  
Costa, Mariana - Universidade Federal do Rio Grande do Norte  
de Melo, Michaela - Université du Québec à Montréal  
Espolau, Greyce - Universidade Federal de São Carlos  
Guido-Giongo, Daniel - Universidade Federal de São Carlos  
Hummer, Eloisa - Universidade Federal de São Carlos  
Junger, Pedro - Universidade Federal de São Carlos  
Lacativa Bagatini, Inessa - Universidade Federal de São Carlos

Perbiche Neves, Gilmar - Universidade Federal de São Carlos

Mateus-Barros, Erick - Universidade Federal de São Carlos

Sarmento, Hugo - Universidade Federal de São Carlos

### **Costa Rica**

Gómez, Eddy - Universidad de Costa Rica

### **Uruguay**

Alonso, Cecilia - CURE-UdelaR

González, Belén - CURE-UdelaR

Griffero, Luciana - CURE-UdelaR

Zanetti, Juan - CURE-UdelaR

### **Protocols**

Protocol of Chlorophyll-*a*: Romina Schaffino and Maria Laura Sánchez

Protocol of quantitative Phytoplankton: María Laura Sánchez and Romina Schiaffino

Protocol of Cytometry: Fernando Unrein and Andrea Malitz

Protocols of Dissolved Nutrients: Martín Graziano, Leonardo Lagomarsino

Protocols of Total Nutrients: María Luz Padulles and Eddy Gómez

Protocol of Environmental DNA: Carmen Sabio y García, Luciana Griffero, Paulina Fermani

Protocol of Dissolved Organic Matter and Dissolved Organic Carbon: Marina Gereá

## **Table of contents**

<b>General indications for sampling</b> .....	1
<b>Section 1: Preparation of material for sampling</b> .....	2
1.1 Chlorophyll-a and nutrients.....	3
1.2 Quantitative Phytoplankton .....	3
1.3 Cytometry.....	4
1.4 Environmental DNA.....	5
1.5 Dissolved Organic Carbon (DOC) and Dissolved Organic Matter (DOM).....	6
<b>Section 2: Field Material and sampling protocol</b> .....	7
2.1 Field measurements.....	8
2.2 Chlorophyll-a and nutrients.....	8
2.3 Quantitative Phytoplankton .....	8
2.4 Cytometry .....	8
2.5 Environmental DNA.....	10
2.6 Dissolved Organic Carbon (DOC) and Dissolved Organic Matter (DOM).....	10
<b>Section 3: Laboratory analysis protocols</b> .....	11
3.1 Turbidity.....	12
3.2 Chlorophyll-a and Nutrients.....	12
3.2.1 Determinación de Clorofila-a.....	13
3.2.2 Nutrientes disueltos.....	15
3.3 Quantitative Phytoplankton.....	15
3.4 Cytometry.....	16
3.5 Environmental DNA.....	17
3.6 Dissolved Organic Carbon (DOC) and Dissolved Organic Matter (DOM).....	20
<b>Section 4: References</b> .....	23
<b>Section 5: Epilogue</b> .....	24



---

## General indications for sampling

This section indicates how sampling will be carried out, how often, the sampling localization in the water body and what parameters will be measured.

### Sampling:

- ✓ Preferentially monthly sampling (eventually bimonthly).
- ✓ Morning sampling, during the second half of the month. If bimonthly, during even months (February, April, June, August, October, December).
- ✓ Sampling in the photic layer of the water body.
- ✓ How to identify the samples: TWO LETTERS FOR SITE\_yymmdd

### Parameters to measure:

#### 1) Chlorophyll-a (Chl-a)

#### 2) Nutrients:

- Total Nutrients ---> Total Phosphorus (TF), Total Nitrogen (TN)
- Dissolved Nutrients ---> Ammonium ( $\text{NH}_4^+$ ), nitrates ( $\text{NO}_3^-$ ), phosphates ( $\text{PO}_4^+$ )

#### 3) Quantitative Phytoplankton

#### 4) Cytometry

- Heterotrophic Bacteria
- Autotrophic picoplankton and nanoplankton

#### 5) Environmental DNA

#### 6) Dissolved Organic Matter (DOM) and Dissolved Organic Carbon (DOC)

## Preparation of material for sampling

The materials to consider for sampling are summarized in the following list. In the following sections the particularities of each parameter are mentioned:

- ✓ 250 or 500 or 1000 ml Plastics flasks (to determine total nutrients, dissolved nutrients/Chlorophyll-a, phytoplankton, environmental DNA, DOC/DOM). For Chlorophyll-a and environmental DNA in marine sites, collect samples in 5-liter drums.
- ✓ 10% HCl
- ✓ Distilled or ultrapure water (ej. Milli-Q®)
- ✓ Acidified Lugol solution (1%) (phytoplankton fixative)
- ✓ 5 or 4.5 ml sterile cryovials with specific fixative defined for each water body (to analyze prokaryotes, picoeukaryotes and nanoplankton by flow cytometry)
- ✓ Cryovial boxes (cytometry)
- ✓ Liquid N<sub>2</sub> thermos (cytometry)
- ✓ Pipette and tips
- ✓ Niskin or Van Dorn Bottle (depending on site)
- ✓ 50  $\mu$ m mesh

Particularities for each parameter will be detail in the following paragraphs.

## 1.1 Chlorophyll-a and Nutrients

Chlorophyll-a and Dissolved Nutrients: wash the plastic flasks with 10% HCl , then rinse with distilled water or ultrapure water at least 3 times. The size of the flask will depend on the volume to be filtered for the determination of Chlorophyll-a concentration. The filtered water (filtrate) will be used to determine the concentration of dissolved nutrients.

Total Nutrients: wash the 250 or 500 ml plastic flasks with 10% HCl , then rinse with distilled water or ultrapure water at least 3 times.

## 1.2 Quantitative Phytoplankton

Wash the 250 or 500 ml plastic flasks with distilled water or ultrapure water and prepare the acidified Lugol solution.

### Preparation of Acidified Lugol solution:

- ✓ Prepare 200 ml of Lugol 13,6% (30 grams of solute in 220 ml of solution = 13,6%*m/v*): 20 g IK + 10 g I<sub>2</sub> in 200 ml of distilled water (we recommend to use a magnetic shaker to accelerate the dissolution) + 10% of glacial acetic acid (20 ml).

Note 1: The acidified Lugol solution is stored in the dark and in the refrigerator (4°C), wrapping the bottle with aluminum foil.

Note 2: Lugol solution is also available in a ready-made format, which must be acidified with 10% glacial acetic acid.

### 1.3 Cytometry

The materials needed to prepare the samples for cytometry are listed below, depending on the fixative to be used (P+G, Glutaraldehyde, or GlyTE) and the type of organisms to be preserved (bacteria, picoautotrophs and nanoplankton):

- Label 4.5 ml cryovials and add 400  $\mu$ l of the fixative you will use (bacteria, picoautotrophs and nanoplankton).

Store the stock of cryovials with the aliquoted fixative in a  $-20^{\circ}\text{C}$  freezer.

The fixative preparations are listed below, according to the type of organisms to be preserved and the sampling site.

#### Preparation of P+G:

Prepare under a fume hood.

To prepare 1 liter of P+G (final concentration 1% Paraformaldehyde + 0.05% Glutaraldehyde):

- Heat 800 ml of PBS 1X to  $60^{\circ}\text{C}$  and maintain at that temperature with a magnetic shaker with heating.
- Add 100 g of Paraformaldehyde.
- Add NaOH lentils one at a time and continue to stir until the solution clarifies (should take 1-5 min).
- Remove from heat
- Add 20 ml of 25% Glutaraldehyde.
- Adjust to pH = 7.2 with HCl.
- Bring to 1 liter with 1X PBS.
- Filter through 0.22  $\mu\text{m}$  polycarbonate filter.
- Aliquot 400  $\mu$ l into each cryovial.
- Store in the freezer at  $-20^{\circ}\text{C}$  (preferably at  $-80^{\circ}\text{C}$ ).

Note: once thawed, the fixative should be stored at  $4^{\circ}\text{C}$  and used within one week, otherwise discarded!

Preparation of GlyTE (solution of glycerol + buffer TE):

- Prepare 100 ml EDTA solution 0.5 M:
  - Add 18.6 g EDTA + 80 ml ultrapure water (While mixing with the magnetic shaker, adjust to pH = 8 by slowly adding NaOH).
  - Add ultrapure water until a final volume of 100 ml.
  - Filter through 0.22  $\mu$ m polycarbonate membrane.
  
- Prepare 100X TE (1 M Tris; 100 mM EDTA):
  - Add 12.1 g of TRIS + 20 ml of 0.5 M EDTA (previously prepared)
  - Bring to 80 ml with ultrapure water (while mixing with the magnetic shaker, adjust to pH = 8 by slowly adding 37% HCl).
  - Add ultrapure water until a final volume of 100 ml.
  - Filter through 0.22  $\mu$ m polycarbonate membrane.
  
- Preparation of GlyTE stock:
  - Mix:
    - 20 ml 100x TE pH = 8,0
    - 60 ml of ultrapure water
    - 100 ml of molecular grade glycerol (use syringe)
  - Filter the GlyTE stock through a 0.22  $\mu$ m membrane and store in refrigerator (4°C).
  - Freshly prepared and filtered GlyTE is aliquoted into cryovials. The volume that remains unaliquoted should be re-filtered before use.

Note: autoclave the remaining 0.5M EDTA and 100X TE solutions and store until the next GlyTE preparation.

#### 1.4 Environmental DNA

Wash 250, 500 ml or higher volume (if needed) plastic flasks with 10% HCl once. Then rinse with distilled water 2-3 times, and a final rinse with ultrapure water. The size of the bottle will depend on the volume that is subsequently filtered.

Wash a filtration system in the same manner as the bottles, for laboratory use.

*Note: in general, 100 to 300 ml of sample is filtered in freshwater systems. In hypereutrophic lagoons such as Chascomús, 30 to 50 ml are filtered. In the sea, 1 to 4 liters are filtered.*

### **1.5 Dissolved Organic Carbon (DOC) and Dissolved Organic Matter (DOM)**

Wash a 250 mL plastic flask once with 10% HCl, and rinse with distilled water 3 times before bringing to the field to collect the water samples.

Wash a glass filtration system with 10% HCl once, and rinse with distilled water 3 times and with ultrapure water once, then muffle at 440°C for at least 1 hour. On the other hand, follow the same washing protocol on 100 ml caramel-colored bottles (which will be used to store the sample for DOC and DOM determinations) and muffle them at 440°C for at least 1 hour. The filtration system and bottle will be used in the laboratory after sampling.

---

## 2.

### ***Material to bring to the field and sampling protocol***

The materials needed for the field are listed below:

- ✓ Field sheet
- ✓ pH meter
- ✓ Conductimeter
- ✓ Oximeter and temperature sensor
- ✓ Secchi disk
- ✓ Niskin or Van Dorn bottle (depending on site)
- ✓ Pipette and tips
- ✓ Marker pen
- ✓ 50  $\mu\text{m}$  mesh or similar
- ✓ Refrigerator, ice and/or ice pack
- ✓ Liquid N<sub>2</sub> thermos (for cytometry)
- ✓ 250 or 500 ml pre-washed plastic bottles (total nutrients, dissolved nutrients/Chlorophyll-a, phytoplankton, environmental DNA, DOC/DOM)
- ✓ Acidified Lugol solution and plastic Pasteur pipette (phytoplankton)
- ✓ 4.5 ml Cryovials with P+G (cytometry): bacteria, picoautotrophs and nanoplankton
- ✓ 4.5 ml Cryovials with GlyTE (cytometry): bacteria, picoautotrophs and nanoplankton
- ✓ Echo sounder or graduated rod for water level measurement
- ✓ Distilled water to wash field sensors (Conductimeter, pH meter, Oximeter) and paper to dry.

Procedure:

**2.1 Field measurements**

Register water temperature, pH, conductivity and dissolved oxygen using field parameter sensors and following the equipment indications.

Identify and survey relevant variables for each environment. For example, width, depth, current velocity, flow, type of surrounding vegetation, etc., can be measured in streams. In lakes and sea, transparency with Secchi disc, surrounding vegetation, depth, etc.

**2.2 Chlorophyll-a and Nutrients**

Collect unfiltered samples of water in the previously rinsed plastic bottles and transport the samples in cold (4°C) and dark conditions.

**2.3 Quantitative phytoplankton**

Collect between 200 and 500 ml (depending on the study site) of unfiltered subsuperficial water in a previously rinsed bottle/flask. Fix sample with 1% acidified Lugol solution (final concentration). Keep in cold (4° C) and dark conditions until posterior analysis.

*Note: if quantification is not done right away, examine samples and add a drop of acidified Lugol (1%) so they do not lose coloration, and continue preserving.*

**2.4 Cytometry**

Collect water samples and pre-filter through a zooplankton net (50 µm mesh).



Distribute the sample into different cryovials containing specific fixatives according to the study site and microorganisms to be analyzed:

- Bacteria, picoautotrophs and nanoplankton: Add 4 ml of sample into 4.5 ml cryovials containing 400  $\mu$ l of either GlyTE or P+G.
- Homogenize each sample by inversion and keep in darkness for 10 minutes.
- Then, submerge samples in liquid nitrogen until they freeze and store in a box at  $-80^{\circ}\text{C}$  (otherwise store at  $-20^{\circ}\text{C}$ ).

Note: video-tutorial for processing and storage of samples available here:

[https://drive.google.com/file/d/1h6cbLzvIX\\_OJ5IX1of0xe03nkOW6sWsh/view?usp=sharing](https://drive.google.com/file/d/1h6cbLzvIX_OJ5IX1of0xe03nkOW6sWsh/view?usp=sharing)



Notes to consider for correct preservation of samples for cytometry:

- Fix the sample as soon as possible, avoiding the fixative to remain defrosted and at room temperature for long periods of time, particularly if using P+G.
- Ideally, take the liquid  $\text{N}_2$  thermos to the sampling site and fix the sample *in situ*.
- If not possible, collect the sample, carry it to the laboratory in cold ( $4^{\circ}\text{C}$ ) and dark conditions and fix it as soon as possible.
- Once defrosted, P+G must be used immediately to fix the sample. If not used right away, it can be stored at  $4^{\circ}\text{C}$  for 1 week at the most. After 1 week it should be discarded. It cannot be re-frozen nor kept at room temperature for long periods of time since the efficiency of fixation is altered.
- **Freezing** is a key point in the preservation of the sample. It is crucial that the fixed sample is frozen as soon as possible, and thus the necessity to count with

liquid N<sub>2</sub>. If you do not have liquid N<sub>2</sub> thermos, freeze at -80°C and, if this option is not available either, freeze at -20°C, although the latter is not recommended.

- In conclusion: **the lower the temperature => the faster the sample freezes => the better the quality of the sample!**
- **The sample must be kept frozen until analysis.** If transporting fixed samples, they must be frozen!

## 2.5 Environmental DNA

Rinse the previously washed bottles with water from the sampling site twice and collect the sample. It is recommended, especially in the more disturbed sites, pre-filtering through a 50 µm mesh.

Transport the sample to the laboratory in cold (4°C) conditions.

## 2.6 Dissolved Organic Carbon (DOC) and dissolved organic matter (DOM)

Collect 250 ml of water sample in the previously rinsed bottle (it is enough for both determinations). Transport the sample in dark conditions and ambient or cold temperature.

---

### 3.

#### ***Protocol for laboratory analysis***

The following list indicates the materials required for lab analysis posterior to sample collection:

- 10% HCl
- Distilled and/or ultrapure water
- Filtration system (Dissolved nutrients/Chlorophyll-a and DNA)
- Reagents, e.g. Hach (Dissolved nutrients)
- Potassium peroxodisulfate ( $K_2O_8S_2$ ) (Total nutrients)
- Boric Acid ( $H_3BO_3$ ) (Total nutrients)
- Sodium Hydroxide (NaOH) 1M (Total nutrients)
- 0.7-0.8  $\mu m$  pore glass fiber membranes (e.g. Whatman GF/F) muffled at 450°C for at least 4 hours (Dissolved nutrients/Chlorophyll-a)
- Aluminum foil (Chlorophyll-a)
- Glass filtering system washed with acid and muffled at 440°C for at least 1 hour (DOC and DOM).
- 0.22  $\mu m$  pore polycarbonate membranes (e.g. Millipore GTTP04700) (DNA)
- 0.3  $\mu m$  pore membranes(optional environmental DNA)
- Polyvinylidene fluoride filters (PVDF) or 0.22  $\mu m$  GV membranes (Millipore - GVWP04700) (DOC and DOM)
- 100 ml caramel-coloured glass bottle muffled at 440°C for at least 1 hour (DOC and DOM)
- Turbidimeter (if available)
- UV spectrophotometer with absorption spectrum capability

Procedure:

### 3.1 Turbidity

- In case you have a turbidimeter, save the specific volume of sample for this measurement according to the equipment requirements.

Note: In case you lack a turbidimeter, carry out a total suspended solids determination based on APHA protocols.

### 3.2 Chlorophyll-a and Nutrients

Total nutrients:

- Bottles containing samples collected in the field are preserved at -20°C until analysis.
- Dissolve 5 g of peroxodisulfate and 3 g of Boric Acid in 35ml of NaOH and bring to final volume of 100 ml with ultrapure water (peroxodisulfate is hard to dissolve; use a magnetic shaker).
- Once dissolved, use the solution in a proportion of 4 ml reagent : 30ml sample.
- Steam sterilize for 90 minutes.
- Cool and filter.
- Carry out the Soluble Reactive Phosphorus and Nitrate determinations.
- Determinations should be based on APHA or EPA protocols. For sea water, Strickland-Parsons (1972) methods are recommended.

Chlorophyll-a and dissolved nutrients:

- Immediately after the field sampling, filter a defined volume of sample through 0.7  $\mu\text{m}$  pore size muffled filters (e.g. Whatman GF/F). It is important to keep the material away from the light so as to reduce photooxidation. Filter sample until filter saturation. Filtered volume will depend on suspended materials. Thus, small volumes about 50-150 ml will be used in eutrophic environments while in oligotrophic or marine environments volumes can range from 1000 to 2000 ml.

- Registered the filtered volume.
- Place filter (folded in half, with retained material pointing inwards) in an aluminum foil envelope labeled with date, name of site, volume filtered and number of filters.
- Keep in  $-20^{\circ}\text{C}$  freezer to induce cell wall breakage and pigment release. Filters can be kept in these conditions for up to 3 weeks.

Nota 1: Filter will be used for Chlorophyll-a determination (Section 3.2.1).

Nota 2: Filtrate will be used for Dissolved nutrients determination (Section 3.2.2).

### **3.2.1 Chlorophyll-a determination:**

This step can be done a few days after filtering the sample and preserving the filter at  $-20^{\circ}\text{C}$ , but it is recommended that it is done before 3 weeks of storage have passed.

- Cut filters in small pieces (5 or 6 pieces) and place in flasks or tubes wrapped in aluminum foil. Add 8 ml of hot (between  $60$  and  $70^{\circ}\text{C}$ ) absolute ethanol per tube, as extraction solvent. In case 2 filters were used for a sample, add 12 ml of solvent instead of 8 ml.
- Vortex or shake vigorously and make sure all pieces of filter are submerged in the ethanol.
- Registered the volume of ethanol added. Absolute ethanol must be heated in an adequate container in a water bath. Control temperature with a thermometer placed in the ethanol.
- Leave samples resting for 24 hours in dark and cold ( $4^{\circ}\text{C}$ ) conditions to enable the extraction of photosynthetic pigments.

The day after the extraction:

- Centrifuge samples for 10 minutes at 3500-4000 rpm.

- Measure absorbance at 665 and 750 nm in the spectrophotometer. Previously measured pure ethanol as a blank.
- In the same cuvette, add 1 drop of HCl 1 N and, after a minute, repeat absorbance measurement at both wavelengths. Do not surpass this amount of HCl, since some accessory pigments may change their absorbance to that of pheophytin-a and thus interfere with the determination.

*Formula for the calculation of Chlorophyll-a concentration:*

$$[\text{Chlorophyll-a without phaeopigments}] = F [(Abs_{1_{665}} - Abs_{1_{750}}) - (Abs_{2_{665}} - Abs_{2_{750}})] k v$$

where Chlorophyll-a without phaeopigments is expressed in  $\mu\text{g}$  per liter; Abs1 = Absorbance before acidifying; Abs2 = Absorbance after acidifying; F = correlation factor that equates the reduction in absorbance with the initial Chlorophyll-a absorbance (2.43 for ethanol, 2.72 for methanol and 2.43 for acetone); k = coefficient of specific absorption (11.2 for ethanol, 11.62 for methanol and 10.48 for acetone); v = volume of extract in ml / (volume of sample x cuvette thickness in cm).

Considerations:

- ✓ Use ACS grade absolute ethanol.
  - ✓ Use cuvettes specific for chlorophyll. Wash with EXTRAN detergent and then rinse again with ethanol.
  - ✓ Calibrate with pure ethanol at 665 nm and 750 nm for the blank.
  - ✓ Repeat calibration every 4 samples to corroborate calibration.
  - ✓ Wash cuvettes with ethanol in between samples.
- Extraction with acetone for marine/saline water:
- Follow the same steps previously detailed, using acetone (non-heated) instead of hot ethanol as extraction solvent.

*Considerations:*

- ✓ Use 90% Acetone.
- ✓ Use cuvettes specific for chlorophyll. Wash with EXTRAN detergent and then rinse again with acetone.
- ✓ Calibrate with pure acetone at 665 nm and 750 nm for the blank.
- ✓ Repeat calibration every 4 samples to corroborate calibration.
- ✓ Wash cuvettes with acetone in between samples.

➤ Extraction with methanol for freshwater samples:

Alternatively to the use of hot ethanol, methanol can be used as an extraction solvent. In this case, a previous inter-calibration must be done in order to check the extraction capability of both solvents. Steps to be followed are the same as with pure ethanol.

**3.2.2 Dissolved nutrients:**

It is recommended that this determination is done the same day or immediate following days after the sample is collected. If nutrient measurement is not done the same day, the filtrate must be stored at -20°C until analysis.

*Note: parameter determination must be done according to APHA or EPA methods. We recommend: Ammonium, salicylate method (EPA Method 350.1) - alternative phenate method, APHA 4500-NH<sub>3</sub>-F; Nitrates: method of reduction by cadmium, APHA4500-NO<sub>3</sub>-E; Orthophosphate: method of vanadate-molybdate, APHA 4500-P-C - ascorbic acid method, APHA 4500-P- E. For seawater, we recommend following Strickland-Parsons (1972) methods.*

**3.3 Quantitative phytoplankton**

- Keep sample refrigerated (4°C) and in darkness until quantification using inverted microscope.

Note: Fixation with Lugol requires a periodic control of the coloration of stored samples, so as to replenish the Lugol which was oxidized. If samples appear discolored, add a drop of acidified Lugol.

### 3.4 Cytometry

By means of a flow cytometer, extracted and fixed samples for analysis of heterotrophic bacteria (1), autotrophic picoplankton (2) and nanophytoplankton (3) will be processed.

Due to the variability in flow cytometers available for each research group, it is not possible to standardize the settings. However, some criteria can be established for the analysis. In general terms:

- The *threshold* must always be set at the "FL1 or FITC" fluorescence for SybrGreen staining and at "FL3 or PerCP" for phytoplankton.
- Add 1  $\mu\text{m}$  sized Yellow-Green beads as a reference for size and fluorescence.
- Registered the analyzed and dilution volumes, flow velocity, tension, setting values and name of files.

#### 3.4.1 Heterotrophic bacteria:

- Bacteria are stained using SybrGreen I.

Preparation of working solution (WS) of SybrGreen I:

- > The 100X WS (working solution) of SybrGreen I is prepared diluting the commercial stock (10.000X) 1 : 100 in DMSO.
- For analysis in the flow cytometer, 100  $\mu\text{l}$  of sample are stained with 1  $\mu\text{l}$  of WS (1X final concentration).
- Incubate at room temperature for 10 minutes in darkness before analysis in the cytometer.
- Bacteria are typically analyzed in two biplots: FL1-SSC and FL3-FL1.



#### 3.4.2 Autotrophic picoplankton:

- Samples are analyzed in the cytometer without staining.
- Typically, FL3-SSC, FL3-FL2 and FL3-FL4 biplots are analyzed. The latter depend on the picocyanobacteria being rich in phycoerythrin (FL2) or phycocyanin (FL4).

#### 3.4.3 Autotrophic nanophytoplankton:

- The same sample and biplots as for autotrophic picoplankton are used, but settings are modified (voltage is lowered) so as to place picoeukaryotes in the lower-left section of the plot and better visualize the nanophytoplankton populations.

### **3.5 Environmental DNA**

#### ***Filtration and preservation procedure***

- Sterilize work surfaces and materials with 70% ethanol
- Filter between 100 and 300 ml of sample (except seawater: between 1 and 4 liters) through 0.22  $\mu\text{m}$  pore filters. To do this, a filtration system previously rinsed (once with 10% HCl, twice with distilled water and once with ultrapure water) will be used. Note: the filtrate obtained (between 100 and 150 ml) may be kept in a caramel-coloured bottle for posterior DOC analysis.
- Preserve each filter in a cryovial or sterile eppendorf tube without buffer, at  $-80^{\circ}\text{C}$ .

Note 1: *In severely disturbed sites a previous filtration through 3  $\mu\text{m}$  filters is recommended to avoid the posterior saturation of the 0.22  $\mu\text{m}$  filter with suspended particles.*

Note 2: *video-tutorial about filtration procedure available here:*

<https://drive.google.com/file/d/1h7XTJY8vcSX59xdISlInn6uTrGJpcbAK/view?usp=sharing>



### 3.5.1 Environmental DNA extraction procedure

We lack a standardized procedure, so each group uses their own protocols. For orientation purposes, we put at disposal two references of extraction procedures, one of them by means of a "home-made" method which is used by several groups (a) and the other using an extraction kit (b):

- a- Protocol of extraction with CTAB buffer: *Fernández Zenoff et al. (2006)*
- b- Protocol with extraction kit: *Lozada et al. (2022)*.

#### a- Protocol CTAB (Modified from *Fernández Zenoff et al. (2006)*)

##### **CTAB followed by extraction with solution of chloroform and isoamyl alcohol:**

- 1) Prepare CTAB (Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide) lysis buffer solution (2% CTAB; 1.4M NaCl, 100 mM Tris-Cl pH 8, 20 mM EDTA pH 8). This solution is stored at room temperature and remains stable for several years. Before using it, add B-Mercaptoetanol at 0.2% final concentration and heat up to 60°C.
- 2) Aliquot CTAB solution in 2 ml eppendorf tubes and add to them each filter.
- 3) Incubate at 60 °C for 30 minutes.
- 4) Then, two purification steps are carried out: add 0.7 ml of chloroform-isoamyl alcohol (24:1) and centrifuge at 14,000 rpm for 10 minutes.  

Note 2: during centrifugation, make sure all tubes are oriented in the same direction, since pellets that will form are not visible with the naked eye.
- 5) Recover the aqueous phase in a 1.5 ml eppendorf tube (avoid catching pellet particles during this step).
- 6) Then, DNA is precipitated in cold isopropanol.

Note 3: Place in the fridge for at least 15 minutes. The longer it stays refrigerated, the more precipitation will occur. Consider leaving it in the fridge overnight.

7) Centrifuge at 14,000 rpm for 10 minutes

Note 4: during centrifugation, make sure all tubes are oriented in the same direction, since pellets that will form are not visible with the naked eye.

8) Remove the supernatant, carefully avoiding the pellet.

9) Then, rinsing steps are necessary. To do this, add cold 80% ethanol.

10) Mix and centrifuge for 2 minutes at 5,000 rpm.

Note 5: for oligotrophic environments, increase centrifugation time to 7 minutes.

11) Repeat rinsing with cold 80% ethanol.

12) Remove the supernatant, avoiding the pellet.

13) Drying and storage

Let the pellet dry at room temperature for 15 minutes with the opening of tubes pointing downwards so as to protect the pellet.

Note 6: drying can be done in a SpeedVac

14) Resuspend pellets in 100 $\mu$ L of ultrapure water.

Note 7: for oligotrophic environments, re-suspend in 50 $\mu$ L;

Nota 8: when adding the water, make sure it washes over the surface where the pellet is attached.

16) Determine DNA concentration in a Nanodrop®, Picodrop® or Fluorometer.

17) Dilute the DNA to a concentration of 10 ng/ $\mu$ L using ultrapure water.

18) Store in the freezer at -20°C.

### **b- Using extraction kits**

DNA can be extracted with the Fast DNA Spin Kit (MP Biomedicals Inc. USA) following the manufacturer's instructions, and quantification with fluorometer or Nanodrop®. For marine samples, procedures by Lozada et al. (2022) can be carried out.

### 3.6 Dissolved Organic Carbon (DOC) and Dissolved Organic Matter (DOM)

- Filter at least 200 ml of sample through 0.22  $\mu\text{m}$  PVDF or GV filters using a previously washed and muffled glass filtration system.
- Save the filtrate in two caramel-coloured bottles with teflon lids, previously washed and muffled. One of them will be destined to DOC analysis and the other to DOM analysis. Do not place aluminum foil between the bottle mouth and the lid.

*Note 1: use 0.22  $\mu\text{m}$  pore polyvinylidene fluoride filters (PVDF), GV Membrane filters (Millipore - GVWPO4700) or PES membrane filters, used previously for the DNA extraction.*

#### 3.6.1 Dissolved Organic Carbon (DOC):

- Preserve samples in cold (4°C) and darkness conditions.
- Process the sample in a carbon analyzer which has NPOC (non-purgable organic carbon) determination.

*Note 2: if the sampled site has a high load of organic matter (e.g. DOC  $\geq$  10 mg/L), add 3 drops of pure HCl for preservation.*

#### 3.6.2 Dissolved organic matter (DOM):

If possible, measure the absorption spectrum of the sample immediately after filtering. To do this, make sure you homogenize the temperature of the sample and of the ultrapure water which will be used as a blank in the spectrophotometer.

- Submerge the flasks containing the samples in a water bath at 20°C for 30 minutes before measuring. It is important to homogenize temperatures so as to avoid noise or irregular variations of the spectrum between 700 and 800 nm, a range that will then be used to correct the sample.
- Once the samples have reached 20°C, turn on the spectrophotometer and let its lamps warm up for at least 30 minutes.
- For the measurement, use a quartz cuvette with the appropriate light path length according to the type of environment (e.g. 1 cm, 5 cm or 10 cm).

- Configure the spectrophotometer to scan the spectrum of absorption of the sample between 200 and 800 nm. Extract the absorbance values for posterior use.
- **In order to optimize and homogenize calculations, the GESAP group (INIBIOMA-Bariloche) prepared an Excel form with macros for all members of the observatories network:**

<https://docs.google.com/spreadsheets/d/1nzTMZoUEo0AXijHO5dEfODJC1OMnaoyW/edit#gid=1978573616>



- This form automatically calculates the steps which are detailed next:
- Correct the absorption spectrum of the sample *a posteriori* of subtracting the absorption spectrum of the ultrapure water. To do this, average the absorbance values between 700 and 800 nm and subtract this average from each of the absorbances of the complete spectrum.
- Depending on your spectrophotometer, absorbance units (AU) should be converted into absorption coefficients (Abs) as follows:  $a = 2.303 A/L$ , where  $a$  is the Neperian absorption coefficient ( $m^{-1}$ ),  $A$  is the absorbance and  $L$  is the light path length through the cuvette (expressed in meters).
- Afterwards, using the corrected spectrum and the conversions into absorption coefficients, calculate:
  - a-  $a_{254}$
  - b-  $a_{350}$
  - c-  $a_{440}$
  - d- The spectral slope  $S_{275-295}$
  - e- SUVA 254 ( $a_{254} \cdot DOC$ )

f- SUVA 350 ( $a_{350}:\text{DOC}$ )

g-  $S_R$

- For each sample, record in the form provided by GESAP:
  - a- geographic location of sampling site,
  - b- volume of sample collected (mL),
  - c- filter used (PVDF, GV or fiberglass),
  - d- spectrophotometer used,
  - e- type of cuvette used (i.e., specify the light path length in meters, e.g. 0.01 m or 0.1 m).

## References

- APHA (American Public Health Association) (1998). Standard methods for the examination of water and wastewater. In: Clescerl LS, Greenberg AE, Eaton AD (eds) Book 20. APHA, Washington, DC, p 4-487.
- Fernández Zenoff V., Siñeriz F. & Farías M.E. (2006). Diverse responses to UV-B radiation and repair mechanisms of bacteria isolated from high-altitude aquatic environments. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(12), 7857-7863. <https://doi.org/10.1128/AEM.01333-06>
- Lozada M., Zabala M.S., García P.E., Diéguez M.C., Bigatti G., Fermani P., Unrein F., Dionisi H.M. (2022). Microbial assemblages associated with the invasive kelp *Undaria pinnatifida* in Patagonian coastal waters: structure and alginolytic potential. *Sci. Total Environ.* 154629. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.154629>
- Strickland J.D.H., Parsons T.R. (1972). A practical handbook of sea-water analysis, 2nd edn. J. Fish. Res. Board Can. 167, 311.

---

## 5.

### *Epilogue*

Teamwork and collaboration are essential to carry out this great project. Undoubtedly, the contribution of each one of us and the predisposition to virtual and face-to-face meetings are the driving force to carry out with enthusiasm the temporary samplings and to plan the long-term projection of the Microbial Observatory Network. Here, we present some photos of the meetings and members together with some Latin American observatory sites.



*2017 - Teamwork of Microbial Observatory network (Uruguay)*





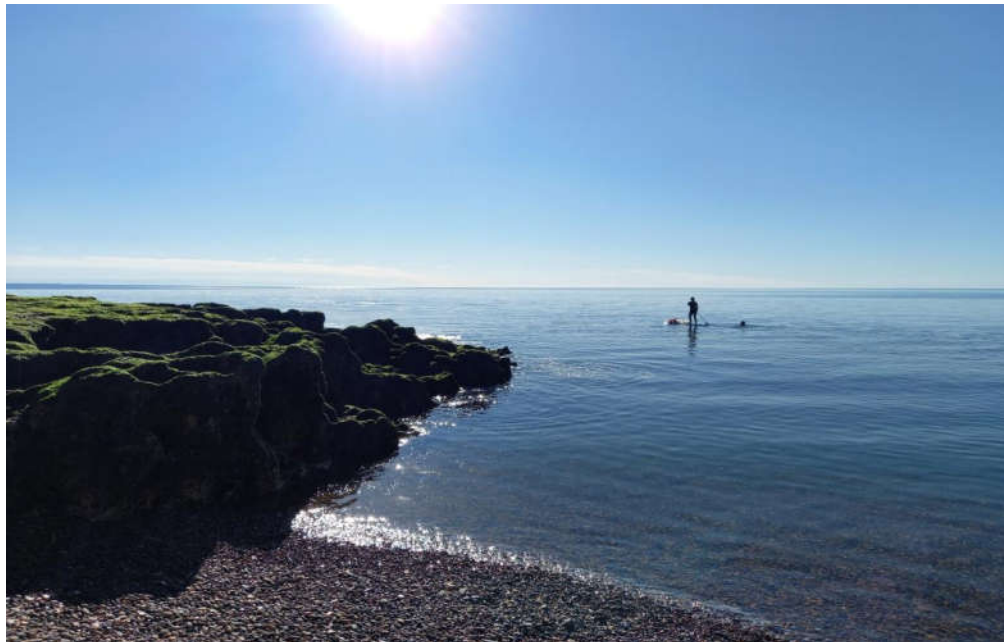
2019 - Teamwork of Microbial Observatory network (Argentina)



2021 - Teamwork of Microbial Observatory network (virtual meeting)



*2022 - Teamwork of Microbial Observatory network (Brasil)*



*Representative picture of marine observatory site, Punta Este, Puerto Madryn, Chubut, Argentina (Photo by Paulina Fermani)*



*Representative picture of lotic freshwater system observatory-site, Arroyo San Francisco, Claypole, Prov. Buenos Aires, Argentina (photo by Martín Graziano).*



*Representative picture of lentic freshwater system observatory-site, Laguna El Trébol, Bariloche, Prov. Río Negro, Argentina (Photo by Cristian D. Torres)*



*Representative picture of lentic freshwater system observatory-site, Reservorio Broa, Itirapina, San Pablo, Brasil (Photo by Erik Mateus-Barros)*