



# Consejo

Distr. general  
31 de enero de 2022  
Español  
Original: inglés

## 27º período de sesiones

### Período de sesiones del Consejo, primera parte

Kingston, 21 de marzo a 1 de abril de 2022

Tema 11 del programa provisional\*

### Proyecto de reglamento sobre explotación de recursos minerales en la Zona

## Proyecto de directrices para el establecimiento de datos ambientales de referencia

Preparado por la Comisión Jurídica y Técnica

## Índice

	<i>Página</i>
I. Introducción .....	4
II. Propósito y ámbito de aplicación .....	4
III. Muestreo y obtención de datos .....	5
A. Variabilidad espacial y temporal .....	5
B. Adaptabilidad de las estrategias de muestreo .....	9
C. Coordinación y cooperación .....	10
D. Calidad de los datos .....	11
E. Gestión de datos y muestras .....	12
IV. Oceanografía física .....	13
A. Introducción .....	13
B. Resolución del muestreo .....	14
C. Variable medida: temperatura y salinidad .....	15
D. Variable medida: corrientes .....	16
E. Variable medida: mareas y olas .....	17
F. Variable medida: turbulencia .....	17

\* ISBA/27/C/L.1.



G.	Variable medida: propiedades ópticas . . . . .	18
H.	Variable medida: ruido . . . . .	20
I.	Calidad de los datos . . . . .	20
J.	Gestión de los datos . . . . .	22
V.	Oceanografía química y biogeoquímica . . . . .	22
A.	Introducción . . . . .	22
B.	Metodología general . . . . .	24
C.	Resolución del muestreo. . . . .	25
D.	Variable medida: nutrientes . . . . .	26
E.	Variable medida: oxígeno . . . . .	28
F.	Variable medida: sistema de carbonatos . . . . .	30
G.	Variable medida: metales traza . . . . .	32
H.	Variable medida: materia orgánica e inorgánica . . . . .	33
I.	Variable medida: trazadores de isótopos radiactivos (radiotrazadores) . . . . .	37
J.	Calidad de los datos . . . . .	39
K.	Gestión de los datos . . . . .	40
VI.	Propiedades geológicas . . . . .	40
A.	Introducción . . . . .	40
B.	Metodología general . . . . .	41
C.	Resolución del muestreo. . . . .	41
D.	Variable medida: batimetría . . . . .	42
E.	Variable medida: propiedades de los sedimentos . . . . .	42
F.	Clasificación del hábitat. . . . .	44
G.	Calidad de los datos . . . . .	44
H.	Gestión de los datos . . . . .	44
VII.	Comunidades biológicas . . . . .	44
A.	Introducción . . . . .	44
B.	Metodología general . . . . .	45
C.	Resolución del muestreo. . . . .	46
D.	Variable medida: comunidades pelágicas . . . . .	47
E.	Variable medida: comunidades bentónicas . . . . .	49
F.	Variable medida: conectividad. . . . .	58
G.	Variable medida: funcionamiento del ecosistema . . . . .	60
H.	Variable medida: ecotoxicología . . . . .	63
I.	Variable medida: mamíferos marinos, tiburones, tortugas y necton de superficie . . . . .	65
J.	Variable medida: aves marinas . . . . .	65

---

K.	Calidad de los datos .....	67
L.	Gestión de los datos .....	69
VIII.	Bibliografía .....	69
IX.	Abreviaciones y acrónimos.....	84

## I. Introducción

1. La Declaración de Impacto Ambiental que debe preparar y presentar quien solicite un Plan de Trabajo en virtud del reglamento sobre explotación de recursos minerales en la Zona (reglamento sobre explotación) debe basarse en los datos ambientales de referencia establecidos como parte de un contrato de exploración de conformidad con el Reglamento sobre Exploración pertinente y las cláusulas y condiciones del Contrato de Exploración.
2. Las presentes Directrices se centran principalmente en los nódulos polimetálicos de aguas profundas que se encuentran en el centro y el noroeste del Océano Pacífico y en el Océano Índico. Algunos elementos pueden no aplicarse a todos los tipos de minerales. En el futuro se publicarán nuevas versiones para tratar los sulfuros masivos polimetálicos del fondo marino y las costras de ferromanganeso con alto contenido de cobalto.
3. Estas Directrices contienen orientaciones sobre el modo en que un solicitante o contratista puede cumplir las exigencias relativas a la obtención de datos de referencia oceanográficos y ambientales. Se basan en las recomendaciones para información de los contratistas con respecto a la evaluación de los posibles efectos ambientales de la exploración de minerales marinos en la Zona ([ISBA/25/LTC/6/Rev.1](#) junto con [ISBA/25/LTC/6/Rev.1/Corr.1](#)).
4. Estas Directrices deben leerse junto con el reglamento sobre explotación, el Reglamento sobre Exploración correspondiente, otras normas, reglamentos y procedimientos pertinentes de la Autoridad Internacional de los Fondos Marinos y otras normas y directrices aplicables, incluidas, entre otras, las relativas a:
  - a) El proceso de Evaluación del Impacto Ambiental;
  - b) La preparación de una Declaración de Impacto Ambiental;
  - c) La preparación de un Plan de Gestión y Vigilancia Ambientales;
  - d) La elaboración y la aplicación de Sistemas de Gestión Ambiental.
5. En caso de incoherencias entre estas Directrices y el reglamento sobre explotación, incluidos sus anexos, o cualquier norma, prevalecerán el reglamento, incluidos sus anexos, y las normas.

## II. Propósito y ámbito de aplicación

6. El objetivo principal de la obtención de datos de referencia es caracterizar el entorno existente para poder evaluar los posibles impactos de la exploración y la explotación en el medio marino antes de que se lleven a cabo dichas actividades. Los datos de referencia también articulan las metodologías y constituyen la base para el seguimiento a largo plazo de los impactos ambientales, y garantizan que los datos de referencia puedan respaldar eficazmente las Evaluaciones del Impacto Ambiental y el Plan de Gestión y Vigilancia Ambientales una vez que comience la explotación.
7. Cuando se presenta la Declaración de Impacto Ambiental, es responsabilidad del solicitante de un Plan de Trabajo ofrecer garantías de que ningún impacto superará los umbrales establecidos. Estas Directrices no pretenden fijar esos umbrales, ni abordar cuestiones relativas a la conservación que deben considerarse en esa fase. Es responsabilidad del solicitante describir cómo se han utilizado los datos de referencia para extraer conclusiones sobre cualquier impacto en ese momento. Las medidas de gestión se determinan en el momento de presentar el Plan de Trabajo, ya que dependen de los datos de referencia obtenidos y de las conclusiones extraídas por el solicitante,

que se evalúan con arreglo a las normas de la comunidad científica en ese momento. Por tanto, es responsabilidad de los solicitantes asegurarse de que los datos son idóneos. Además, los datos de referencia facilitados sirven de base para los Planes de Gestión Ambiental Regionales.

8. Un muestreo correctamente diseñado es la piedra angular de los estudios y la vigilancia ambientales. Si las muestras no se toman en número suficiente, abarcando la superficie suficiente y con el equipo correcto de acuerdo con las mejores técnicas disponibles y las mejores prácticas en el sector, todos los datos y análisis posteriores contendrán errores o se verán entredicho. El seguimiento de estas mejores prácticas también garantiza que el muestreo no tenga un impacto adicional innecesario en el entorno.

9. Estas Directrices contienen orientaciones sobre los siguientes aspectos:

a) Ámbito de aplicación, cobertura y normalización de los datos de referencia necesarios para caracterizar las propiedades físicas, químicas y geológicas y las comunidades biológicas de la Zona y la columna de agua, las cuales pueden verse afectadas por la actividad minera;

b) Procedimientos de examen y evaluación para valorar la calidad de los datos ambientales de referencia y el rigor estadístico necesario para detectar y diferenciar los cambios respecto a los niveles de referencia o de fondo;

c) Gestión de los datos, especialmente en lo que se refiere a los metadatos necesarios para contribuir al depósito de datos y la información relativa a las bases de referencia ambientales.

10. En estas Directrices, los datos de referencia que deben recogerse se agrupan en los siguientes epígrafes:

- a) Oceanografía física;
- b) Oceanografía química y biogeoquímica;
- c) Propiedades geológicas;
- d) Comunidades biológicas.

### **III. Muestreo y obtención de datos**

11. Los datos de referencia deben ser multidisciplinarios para permitir una evaluación global de las condiciones y los procesos ambientales. El muestreo y la repetición son necesarios para crear una representación adecuada del entorno que permita detectar cambios y determinar si estos guardan relación con las operaciones mineras o, por el contrario, son consecuencia de la variabilidad y las tendencias espaciales y temporales naturales o de actividades humanas no relacionadas con la minería. Sin ese conocimiento, los cambios respecto de las condiciones previas a la actividad minera observados durante las operaciones mineras nunca podrían atribuirse a causas distintas de las actividades de explotación. Por tanto, antes de iniciar la fase de explotación minera comercial, se debe recopilar información exhaustiva sobre la variabilidad natural de los parámetros de referencia.

#### **A. Variabilidad espacial y temporal**

12. Es probable que la magnitud y las escalas espaciotemporales de la variabilidad sean diferentes para las distintas variables y para los distintos componentes del ecosistema. Por consiguiente, es probable que la repetición y la frecuencia necesarias

para abordar la variabilidad también difieran para los distintos componentes. Para abarcar adecuadamente la variabilidad temporal y espacial y reducir la incertidumbre vinculada a los datos, deben llevarse a cabo observaciones repetidas para detectar los cambios debidos al tiempo (estaciones, variabilidad interanual) y el espacio (horizontal y vertical), y diferenciar entre unas regiones y otras.

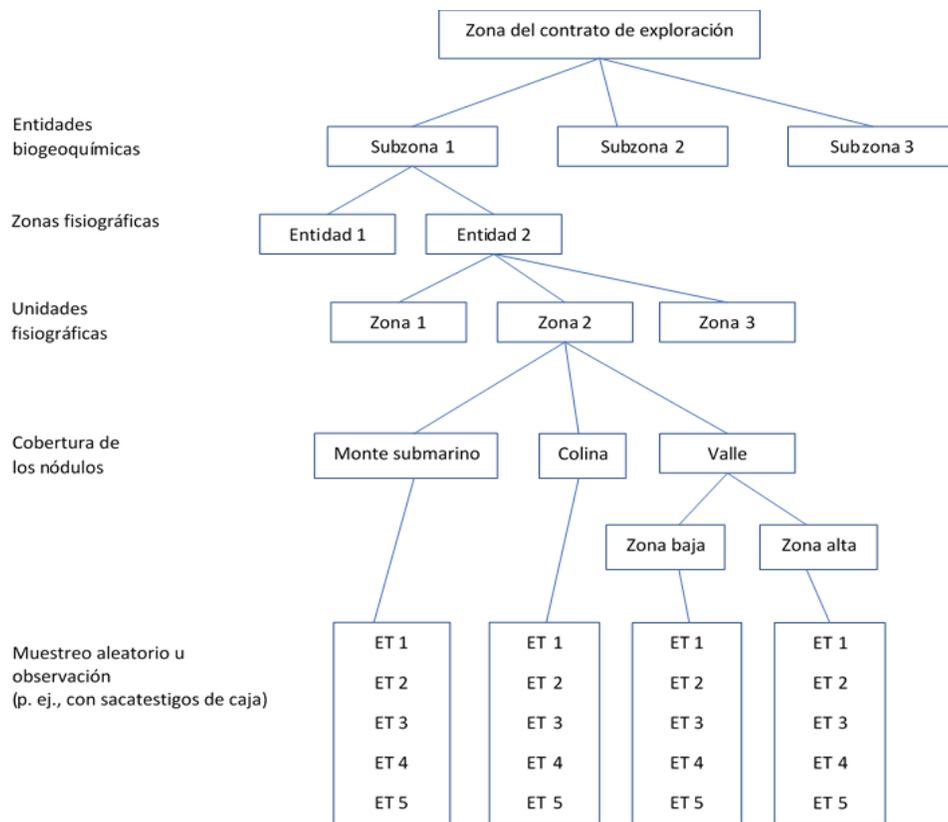
13. Los lugares de muestreo de referencia deben reunir los requisitos necesarios para la vigilancia durante las futuras operaciones mineras. Por tanto, deben ubicarse de manera que puedan servir más tarde como zonas de referencia para los efectos y zonas de referencia para la preservación. También deben establecerse en número suficiente para que los efectos relacionados con los impactos directos e indirectos puedan abordarse con el rigor estadístico necesario. Al elegir una disposición, deben tenerse en cuenta parámetros como la variación natural de las condiciones oceánicas, incluidas las direcciones de las corrientes oceánicas, las características topográficas importantes y el tipo de sustrato (por ejemplo, sustratos blandos y duros), ya que estos influirán en la dirección y la distancia del movimiento (dispersión y depósito) de los penachos de sedimentos generados por el colector de extracción.

14. Para determinar los biomas importantes de gran escala deben utilizarse las referencias establecidas de la biogeografía oceánica mundial; véase, por ejemplo, Longhurst (1998) en relación con el medio epipelágico, Sutton *et al.* (2017) en relación con el medio mesopelágico y Watling *et al.* (2013) en relación con el medio bentónico. Las nuevas biogeografías centran actualmente los proyectos de investigación, al igual que las biorregionalizaciones, también llamadas mapas de hábitat a gran escala, que pueden representar una herramienta más práctica para contribuir a las iniciativas de gestión espacial (McQuaid *et al.*, 2020). Las unidades ecológicas marinas de Esri ([www.esri.com/en-us/about/science/ecological-marine-units/overview](http://www.esri.com/en-us/about/science/ecological-marine-units/overview)) pueden ser una referencia útil, pero no sustituyen a la recopilación y el análisis de datos adicionales específicos del área en cuestión. Las principales corrientes deben ser cartografiadas a lo largo de la columna de agua y deben determinarse las características pertinentes de mesoescala y submesoescala dentro de la zona de muestreo (tamaño: 1 a 100 km), como los meandros, los remolinos y los frentes, así como las características influenciadas por la topografía submarina, como las estelas de los montes submarinos y las columnas de Taylor. Los datos de teledetección archivados de altimetría por satélite y temperatura superficial del mar deben ser consultados y analizados para detectar las corrientes y las características oceanográficas de la superficie. La zona considerada debe extenderse más allá de la zona del contrato para abarcar los principales sistemas de corrientes de la región y su variabilidad, incluidas las zonas de origen de las principales variables de la mesoescala, como los remolinos. Ello es necesario para decidir qué zona incluir en la modelización oceanográfica y para comprender el posible origen de las observaciones oceanográficas y biológicas dentro de la zona del contrato. Para detectar los cambios estacionales e interanuales y abarcar fenómenos oceanográficos poco frecuentes, como El Niño, así como las tendencias decenales, se necesita una serie cronológica que se extienda al menos 20 años atrás y que comprenda los datos de temperatura de microondas e infrarrojos. Las series cronológicas deben enriquecerse con datos del color del océano, y las zonas consideradas deben ser examinadas para validar los biomas y determinar la variabilidad interanual. (Henson *et al.*, 2010). Deben determinarse las principales estaciones.

15. En zonas casi homogéneas, como el interior de una región de giro sobre una llanura abisal, puede haber solo una zona vertical detectable. Los gradientes latitudinales o longitudinales pueden indicar más de un estrato. En las proximidades de los frentes y las dorsales mesoceánicas puede haber una considerable heterogeneidad espacial que genere múltiples zonas. En las zonas de remolinos, el muestreo debe ser flexible a fin de incluir remolinos anticiclónicos y ciclónicos.

16. Para obtener muestras de sedimentos, agua intersticial y organismos vivos (incluidos el ADN ambiental y las muestras destinadas al análisis molecular), debe utilizarse un sistema de muestreo estratificado anidado para que la recogida de muestras y datos abarque todos los entornos ambientales de la escala de una zona de contrato de exploración, como se describe en la figura siguiente. Sobre la base de los datos recogidos para otras variables —principalmente, la oceanografía física (véase la sección IV), la oceanografía química (véase la sección V) y las propiedades geológicas (véase la sección VI)—, las regiones deben dividirse en entidades biogeoquímicas y batimétricas. En el seno de cada una de esas entidades, debe establecerse un conjunto anidado de zonas fisiográficas, elementos o rasgos geomorfológicos y unidades con diferentes topografías y diferentes coberturas de nódulos (abundancia y tamaño) para abarcar enteramente las condiciones que se espera que sean fuerzas motrices importantes de los cambios en las funciones comunitarias y biogeoquímicas. Cada zona fisiográfica es un complejo de unidades fisiográficas dentro de un área definida. Estas unidades fisiográficas suelen abarcar montes submarinos, llanuras abisales, colinas, laderas, crestas y valles, con una abundancia de nódulos de varios tamaños que oscila entre baja y alta. Deben definirse unidades adicionales según sea necesario para abarcar las condiciones específicas y su variabilidad en las respectivas zonas de los contratos. En la figura siguiente se muestra esa distribución. La ubicación y la extensión de las unidades deben definirse a partir de una batimetría realizada con una embarcación y de imágenes acústicas y ópticas de alta resolución del fondo marino, como las obtenidas con vehículos operados por control remoto, vehículos submarinos autónomos o equipos desplegados mediante cable.

#### Esquema conceptual de un programa de muestreo



*Abreviación:* ET, extracción de testigos (con sacatestigos de caja).

17. Las observaciones deben realizarse en momentos diferentes y predeterminados del año para abarcar los cambios estacionales de la productividad y las condiciones hidrodinámicas. En concreto, deben abarcarse períodos con regímenes hidrológicos del agua de fondo diferentes y estaciones con distinta disponibilidad de materia orgánica. Además, deben cuantificarse los cambios a lo largo de las 24 horas del día cuando sean importantes (por ejemplo, en los sistemas pelágicos).

18. Cuando los parámetros muestren una variabilidad temporal considerable que no pueda abordarse realizando observaciones discretas y cuando existan tecnologías de observación adecuadas, como plataformas autónomas, sensores y muestreadores, las observaciones deberán realizarse de forma continua y con una alta frecuencia. Deben programarse períodos de observación continua para abarcar la escala temporal de una variable determinada en un lugar determinado, como en el caso de, por ejemplo, los ciclos de las mareas o los ciclos de productividad estacionales. Deben incluirse observaciones de sistemas bentónicos que se ha comprobado que muestran dinámicas temporales importantes en entornos de aguas profundas (Davies *et al.*, 2009).

19. Los parámetros que no se espere que muestren una variabilidad estacional significativa deben validarse al menos una vez comparando las observaciones en estaciones diferentes (primavera/verano e invierno).

20. Deben realizarse observaciones en estaciones o condiciones ambientales similares para evaluar la variabilidad interanual. Dado que los cambios interanuales pueden producirse a lo largo de varios años, la realización de observaciones durante varios años aumenta la probabilidad de detectar fenómenos periódicos. Además, la estrategia de muestreo temporal debe abarcar los cambios interanuales e incluir posibles variaciones periódicas, como las relacionadas con El Niño-Oscilación Austral. Al elaborar una base de referencia ambiental, deben tenerse en cuenta otros factores de estrés naturales, como el calentamiento global y el aumento de los niveles de CO<sub>2</sub> en la atmósfera, su impacto en el entorno donde se recogen los datos de referencia y su variabilidad temporal. Además, hay que asegurarse de que cualquier variabilidad observada no sea un artefacto de la perturbación causada por un muestreo anterior.

21. Cuando se realizan comparaciones temporales o espaciales, el otro componente debe mantenerse constante. Por ejemplo, para hacer una comparación entre dos estaciones, se deben comparar muestras de la misma unidad fisiográfica y de la misma profundidad.

22. A menos que se indique lo contrario en las secciones sobre las distintas variables, la resolución del muestreo vertical debe ser la siguiente:

a) Para el muestreo de la columna de agua (incluidas las mediciones físicas, a menos que se indique lo contrario en la sección IV.B), debe utilizarse una resolución más alta para muestrear los 200 m situados bajo la superficie (tres o cuatro muestras a profundidades determinadas en función de la variabilidad local) y los 500 m situados sobre el fondo marino (por ejemplo, a 5 m, 10 m, 25 m, 50 m, 75 m, 100 m, 150 m, 200 m y 500 m por encima del fondo marino), teniendo en cuenta que las condiciones meteorológicas de la superficie y la topografía concreta pueden afectar a la resolución factible muy cerca del fondo marino;

b) Para el muestreo del fondo marino, a menos que se indique una resolución mayor en las secciones sobre variables específicas, la resolución vertical debe ser de 0-0,5 cm, 0,5-1 cm, cada centímetro hasta una profundidad de 10 cm y cada 2 cm desde una profundidad de 10 cm hasta una profundidad de 20 cm o hasta la profundidad a la que se espera que el sedimento se vea afectado por el equipo de minería, lo que sea más profundo. Cuando se requieran mediciones más profundas, se tomarán muestras cada 5 cm entre una profundidad de 20 cm y una profundidad de

50 cm, y cada 20 cm en capas más profundas sobre una columna estratigráfica de hasta 5 m. Esta resolución debe considerarse orientativa y debe aumentarse cuando los estudios iniciales realizados a alta resolución, como los empleados para determinar la zonación de oxidación-reducción, indiquen que se necesitan más capas para caracterizar adecuadamente los perfiles verticales. Cuando los sedimentos superficiales son más fluidos y no es posible tomar cortes de resolución fina, hay que adoptar un planteamiento más pragmático y tomar muestras de 0 a 1 cm.

23. Deben obtenerse réplicas aleatorias de cada punto de muestreo y la repetición debe ser suficiente para abarcar la variabilidad y discriminar entre unidades fisiográficas. El número de repeticiones necesarias para caracterizar las condiciones de referencia en una zona específica se determina en función de una serie de factores, incluida la variable que se está considerando, y es probable que difiera entre las distintas zonas de los contratos. Por tanto, el número de repeticiones debe justificarse utilizando estadísticas adecuadas. Se espera una menor variabilidad temporal y espacial en las capas sedimentarias más profundas. Por ello, para evaluar las condiciones de las capas sedimentarias más profundas, las mediciones en un solo testigo largo tomado en cada punto y repetidas a lo largo de varias campañas pueden ser suficientes, a menos que se observen variaciones temporales o espaciales importantes a pequeña escala.

24. Las muestras o los datos recogidos durante el mismo despliegue de una única plataforma, como los testigos procedentes del despliegue único de un sacatestigos múltiple o los múltiples sensores de una única plataforma sobre el fondo, deben considerarse un mismo punto de muestreo (es decir, una réplica biológica). Cuando se subdividan las muestras, el propósito debe ser obtener diferentes variables de la misma muestra y no crear pseudomuestras. Las pseudomuestras se crean cuando se toman submuestras de la misma muestra principal, como un testigo extraído con un sacatestigos de caja o varios testigos extraídos a la vez por un único sacatestigos múltiple, y se tratan como réplicas. Estas muestras no son estadísticamente independientes.

25. En los casos en que el muestreo necesario para determinar la variabilidad espacial y temporal no se detalle en las secciones pertinentes que figuran a continuación, los protocolos que deben seguirse son los indicados en el documento [ISBA/25/LTC/6/Rev.1](#) junto con [ISBA/25/LTC/6/Rev.1/Corr.1](#).

## **B. Adaptabilidad de las estrategias de muestreo**

26. Las estrategias iniciales de muestreo y observación deben basarse en los mejores datos e investigaciones de que se disponga. Las estrategias deben examinarse periódicamente a medida que se disponga de más información para asegurarse de que sean idóneas y de que detecten adecuadamente la variabilidad espacial y temporal. Hay que demostrar que las observaciones realizadas en zonas o escalas espaciales que se han considerado homogéneas muestran efectivamente menos variabilidad que las observaciones realizadas en zonas en las que se esperaba más variabilidad. Asimismo, debe establecerse si las observaciones realizadas en temporadas similares son menos variables que las realizadas en épocas distintas del año. Sin embargo, los cambios en la estrategia de muestreo deben realizarse con precaución para no pasar por alto acontecimientos episódicos, dejar sin resolver la variabilidad interanual o generar incoherencias que impidan un análisis temporal, especialmente si las observaciones se interrumpen en determinados lugares o durante determinadas estaciones.

27. Se ha recabado la opinión de los expertos para asegurarse de que las metodologías de las presentes Directrices se corresponden con las mejores prácticas. Sin embargo, las técnicas y los procesos se desarrollan con el tiempo. Por tanto, para

caracterizar adecuadamente el entorno se deben utilizar las mejores técnicas disponibles o, de no ser así, ofrecer una justificación. Debe solicitarse la opinión independiente de una organización o persona con experiencia en la materia para poder hacer los ajustes necesarios. Cuando la recogida de datos ya ha comenzado, hay que procurar garantizar la coherencia de los datos obtenidos mediante los diferentes sistemas, de modo que se puedan llevar a cabo evaluaciones integradas de todos los datos recogidos.

28. A medida que se vayan conociendo los detalles de la tecnología que se utilizará para explotar los recursos y que avance la exploración, el programa de muestreo deberá ajustarse según sea necesario para que los datos de referencia se centren en las zonas en las que se espera que se lleve a cabo la extracción y en las que es probable que se observe algún impacto. Ello es especialmente importante cuando la posible profundidad de la excavación supere las profundidades de muestreo propuestas para las distintas variables o cuando se detecte una variabilidad considerable en los parámetros.

### **C. Coordinación y cooperación**

29. En la medida de lo posible, las mediciones de las diferentes variables deben estar relacionadas tanto temporal como espacialmente para facilitar el análisis integrado de los datos y mejorar la capacidad explicativa. Esta cuestión reviste especial importancia en el caso de las variables que son pertinentes para procesos interconectados o similares que pertenecen al ámbito de las mismas disciplinas o de disciplinas estrechamente conectadas (por ejemplo, geología y biogeoquímica de los sedimentos, oceanografía y química oceánica, biología pelágica, etc.) o que deben combinarse para crear productos derivados. Cuando la metodología sea compatible, deben utilizarse muestras procedentes de testigos sedimentarios únicos para analizar múltiples parámetros (por ejemplo, los mismos testigos para las características del agua intersticial y de los sedimentos). Los testigos extraídos con sacatestigos de caja para muestrear la macrofauna no deben dividirse en submuestras (véase la sección VII, párrafos 234 a 237).

30. Los contratistas deben colaborar e intercambiar datos e información entre ellos y con la comunidad científica siempre que sea posible para posibilitar análisis que trasciendan las zonas de los contratos de los contratistas particulares. De este modo, se obtendrá un contexto en forma de patrones a mayor escala. Ese contexto puede facilitar la interpretación y el uso de las observaciones de referencia y sustentar un análisis a mayor escala, cuyo resultado puede servir de base para los Planes de Gestión Ambiental Regionales. Otra ventaja de este sistema es que reduce la carga de los contratistas particulares.

31. Se recomienda encarecidamente el intercambio de datos entre los contratistas y la comunidad científica para garantizar que se han obtenido datos de alta calidad siguiendo la metodología más avanzada.

32. Muchas de las variables analizadas en estas Directrices también se contemplan en el GOOS ([www.goosocean.org](http://www.goosocean.org)). El GOOS ha creado un marco en torno a las variables oceánicas esenciales que puede utilizarse para elaborar un plan rentable mediante el que recopilar una perspectiva general óptima de cada variable oceánica esencial. Muchas de las variables de estas Directrices tienen asociada una ficha de variable oceánica esencial que ha sido creada y difundida por los grupos de expertos. Las fichas informativas indican las mediciones que se deben hacer, las opciones de observación disponibles y las prácticas de gestión de datos que se deben seguir. Remiten al usuario a las mejores prácticas y guías y contienen información de referencia. La información que contienen es un complemento de estas Directrices. El

conjunto actual de variables oceánicas esenciales contiene observaciones de oceanografía física y biogeoquímica, pero carece de información importante sobre biología y biogeoquímica bentónica.

#### **D. Calidad de los datos**

33. Todas las mediciones deben compararse con observaciones de la misma región o de profundidades y zonas biogeográficas similares que estén disponibles en la literatura científica y en otras fuentes. Una buena concordancia entre los modelos más punteros y las observaciones de las variables se considera un sólido indicio de que el conjunto de datos de referencia tiene buena calidad, coherencia y exhaustividad. Por tanto, la comparación de las observaciones con los resultados de los modelos debe ser un componente esencial de los informes y debe incluir una referencia a toda la información necesaria para ejecutar el modelo y reproducir los resultados. Cuando se produzcan discrepancias entre las mediciones y el modelo, habrá que investigarlas para resolver el error. Para ello puede ser necesario adaptar el modelo o recoger más muestras.

34. Si se observan grandes desviaciones que no pueden atribuirse a diferencias entre los entornos ambientales, los métodos deben comprobarse o validarse de forma cruzada con otros laboratorios.

35. El flujo de trabajo completo, incluida la información detallada sobre la metodología de medición y el control de calidad (por ejemplo, las normas y los blancos medidos), debe estar completamente documentado, especialmente en los casos en que no se disponga de normas o en que los métodos aplicados se desvíen de las normas acordadas. Cuando se utilicen métodos no normalizados, estos deben compartirse abiertamente mediante su publicación en las revistas pertinentes o en las bases de datos de métodos establecidas (por ejemplo, el Sistema de Mejores Prácticas Oceánicas de la COI o la plataforma protocols.io).

36. El número de réplicas necesarias dentro de cada unidad fisiográfica depende de la variabilidad natural existente (según se ha mencionado antes). Deben utilizarse métodos estadísticos, incluido el análisis de la potencia (Jumars, 1981), para decidir la cantidad de muestreo que se necesita para detectar cambios relativos con una resolución adecuada.

37. La incertidumbre y los umbrales de detección de la metodología deben presentarse junto con las mediciones.

38. Si los datos se corrigen en función de la profundidad, la temperatura, el tamaño de la muestra o cualquier otra variable, se deben proporcionar detalles de la corrección y explicar el procedimiento exacto. Esa información debe ir acompañada de los datos brutos.

39. Cuando se utilicen diferentes metodologías como consecuencia de la adaptabilidad de las estrategias de muestreo o a través de la cooperación entre estudios, se deben proporcionar todos los detalles sobre la metodología de normalización para que los resultados sean comparables.

40. Cuando los dispositivos de muestreo necesiten calibrarse, se debe hacer lo más cerca posible del momento de su uso (por ejemplo, para obtener el microperfil de pH *in situ*, los electrodos deben calibrarse a bordo del buque de muestreo antes de su despliegue).

41. La información contenida en estas Directrices hace referencia a las expectativas mínimas. Cualquier muestreo o análisis adicional que vaya más allá de lo indicado en

este documento y en los demás documentos citados aumentará la calidad y, por tanto, se alienta su uso.

## **E. Gestión de datos y muestras**

42. Los datos (incluidos los metadatos), las muestras y los especímenes deben archivarlos utilizando las normas adecuadas de conservación a largo plazo para poder volver a consultar la información en bruto, en caso de que sea necesario realizar nuevos análisis o controles de calidad.

43. El contratista debe archivar los datos brutos de manera que se pueda hacer un seguimiento hasta su origen. Deben incluirse el lugar y el momento de la recogida y la metodología utilizada.

44. Los datos brutos y derivados deben enviarse, en un formato acordado, a centros de recopilación de datos mundiales establecidos y mantenidos a largo plazo que proporcionen libre acceso.

45. Los datos digitales, incluidos los metadatos pertinentes, deben almacenarse de forma segura tanto a nivel local como en la nube para garantizar su disponibilidad a largo plazo. También deben facilitarse a la secretaría de la Autoridad, tal como se establece en las Recomendaciones para orientar a los contratistas respecto al contenido, el formato y la estructura de sus informes anuales (ISBA/21/LTC/15).

46. Los datos y las conclusiones deben publicarse en revistas científicas internacionales, revisadas por pares y de acceso abierto, y deben presentarse en conferencias científicas internacionales para facilitar la difusión de nueva información. Además, la publicación permite que distintos expertos independientes den su opinión y aprobación.

47. La latitud y la longitud deben recogerse en grados decimales de acuerdo con el Sistema Geodésico Mundial 1984, y la fecha y la hora deben registrarse según el tiempo universal coordinado. Los formatos de los informes deben seguir las normas internacionales aceptadas.

48. Deben registrarse los metadatos normalizados (incluida la posición, la profundidad del agua, la identificación de la expedición, la identificación de la estación y el investigador principal) siguiendo las normas sobre metadatos establecidas.

49. Como parte de la presentación de datos a la Autoridad, los contratistas deben proporcionar información detallada sobre los sensores y el dispositivo de muestreo utilizados (tipo, fabricante, identificación, fecha y método de la última calibración) y dar una descripción detallada de los métodos de medición y análisis de muestras empleados, incluidos los detalles sobre el despliegue del equipo de muestreo, la información de referencia relativa a las normas adoptadas, las mejores prácticas seguidas o la descripción de los métodos en las posteriores publicaciones científicas, de conformidad con las directrices pertinentes.

50. Cuando la metainformación contenga referencias a publicaciones (como informes de cruceros o descripciones de métodos), deben facilitarse elementos de identificación persistentes o duplicados para garantizar la disponibilidad a largo plazo.

51. En el caso de los datos derivados, es necesario suministrar los metadatos pertinentes, incluida toda la información necesaria para reproducir los análisis, si hace falta junto con las conversiones aplicadas. Debe proporcionarse una referencia a los datos brutos, lo cual debe incluir las mediciones del testigo y todas las variables de

apoyo utilizadas para los cálculos. Los protocolos, los programas informáticos y el código utilizados deben especificarse en recursos en línea duraderos y de libre acceso que permitan el control de versiones y contengan elementos de identificación persistentes (por ejemplo, GitHub o la plataforma protocols.io).

52. Estos principios se aplican a todas las variables. En las secciones siguientes figura más información al respecto.

## IV. Oceanografía física

### A. Introducción

53. Los principales objetivos para establecer una base de referencia de la oceanografía física de una zona del contrato son los siguientes:

- a) Definir las condiciones hidrofísicas e hidrodinámicas y la estructura de la columna de agua y su variabilidad a fin de:
  - i) Conocer los hábitats de los organismos marinos;
  - ii) Definir una estrategia de muestreo detallada para otras medidas de muestreo;
- b) Evaluar la posible dispersión, el tamaño y las características de cualquier penacho operacional y de descarga.

54. Para definir la base de referencia de la oceanografía física deben determinarse las siguientes variables:

- a) Temperatura, presión y salinidad: los parámetros del agua de mar que determinan la estratificación de la columna de agua y las masas de agua discretas dentro de las cuales deben medirse otras variables. Estas variables también serán necesarias cuando se extraiga información de otros datos;
- b) Corrientes: el conocimiento de las corrientes es crucial para entender la conectividad de las poblaciones de organismos marinos y para evaluar la dispersión de cualquier penacho operacional y de descarga;
- c) Mareas y olas: las mareas y las olas interactúan con el flujo de la corriente e influyen en la mezcla. Las mareas también afectan a algunos organismos marinos (ciclos de mareas);
- d) Turbulencia: la mezcla turbulenta vertical es un factor dominante en el control del flujo vertical de material en la columna de agua; por otro lado, la mezcla turbulenta potenciada por el fondo desempeña una función importante en la transformación de la masa de agua;
- e) Propiedades ópticas: la penetración y la disponibilidad de luz son cruciales para muchos procesos en la zona superior de la columna de agua, incluida la formación de biomasa por parte del fitoplancton oceánico a través de la fotosíntesis, el ciclo biogeoquímico a través de reacciones fotoquímicas y el calentamiento de la capa superior del océano. Las propiedades ópticas también abarcan el campo de luz pertinente para las especies de fauna que utilizan la bioluminiscencia para alimentarse, ocultarse y reproducirse. Las partículas de sedimento de una penacho de desagüe pueden impedir que la fauna utilice la bioluminiscencia, lo que obstaculizará el apareamiento o la alimentación;
- f) Ruido: el ruido proviene de numerosas fuentes situadas tanto en el interior del océano como en su superficie. Puede afectar a una serie de organismos marinos, como invertebrados, peces y mamíferos marinos. Las especies marinas pueden verse

afectadas en cuanto a su desarrollo, anatomía, fisiología, comportamiento, servicios ecosistémicos y tasas de mortalidad, lo que a su vez tiene un impacto socioeconómico en la pesca. Además, las actividades que generan ruido pueden afectar a la salud de la población, al bienestar de las especies marinas y a la dinámica del ecosistema.

## **B. Resolución del muestreo**

55. En muchos métodos de muestreo físico, debe utilizarse el mismo dispositivo de muestreo para tomar varias muestras al mismo tiempo. Este sistema aumenta en gran medida la resolución y debe utilizarse siempre que sea posible.

56. La variabilidad de los parámetros físicos debe determinarse mediante metodología de muestreo diferente, como se indica a continuación:

a) Variabilidad espacial (vertical): estaciones (sondas CTD y muestreadores de agua), LADCP, flotadores o boyas de deriva, AUV o planeadores submarinos y ADCP a bordo de embarcaciones;

b) Variabilidad espacial (horizontal): secciones (sondas CTD y muestreadores de agua), flotadores o boyas de deriva, AUV o planeadores submarinos, ADCP a bordo de embarcaciones y teledetección por satélite;

c) Variabilidad temporal: amarres o boyas con ADCP u otros correntómetros, estaciones o secciones repetidas, flotadores o boyas de deriva, plataformas sobre el fondo y teledetección por satélite.

57. Las mediciones y los muestreos oceanográficos e hidroquímicos deben realizarse en las mismas estaciones utilizadas para el muestreo biológico, y debe hacerse al menos una medición dentro de cada zona fisiográfica. Cuando las distancias entre las zonas fisiográficas sean superiores a 50 km, se recomienda incluir estaciones adicionales, al menos una estación cada 50 km, tanto en dirección latitudinal como longitudinal, con una resolución mayor en las zonas con gradientes horizontales considerables o características topográficas de gran escala (una estación cada 10-30 km).

58. Las sondas CTD deben utilizarse con sensores adicionales (por ejemplo, para la turbidez, el oxígeno disuelto, el pH, la fluorescencia o la radiación fotosintéticamente activa), y deben combinarse con un muestreador de agua en forma de roseta para estudiar la variabilidad vertical de las propiedades físicas y químicas de la columna de agua. En el caso de los parámetros físicos, la resolución del muestreo debe ser mayor que la de los demás parámetros. Por tanto, además de las profundidades indicadas en el apartado 22, se deben tomar muestras a 0 m, 10 m, 25 m, 30 m, 50 m, 75 m, 100 m, 125 m, 150 m, 200 m, 250 m y 300 m, y luego cada 100 m hasta 1.600 m, 1.750 m y 2.000 m, y después cada 500 m hasta 200 m por encima del fondo marino.

59. Este sistema de muestreo debe modificarse según sea necesario para garantizar que se recojan todas las características importantes de la columna de agua.

60. A fin de estudiar la variabilidad diurna de las propiedades de la columna de agua, debe establecerse una estación diurna para cada unidad fisiográfica. Las muestras deben tomarse desde la superficie hasta una profundidad de 200 m. Como se indica en la sección III.A, el muestreo debe repetirse cada temporada durante varios años para determinar la variabilidad anual e interanual.

61. Además de las profundidades indicadas en la sección III.A, se deben medir las corrientes en la superficie y a las siguientes profundidades: 10 m, 25 m, 50 m, 100 m, 200 m, 300 m, 500 m, 750 m, 1.000 m, 1.200 m y 1.500 m, y luego cada 500 m hasta

llegar a 200 m por encima del fondo marino. Este sistema debe modificarse si la estructura vertical de las masas de agua indica que es necesario hacerlo. Se puede utilizar una combinación de ADCP montados en diferentes soportes para obtener y muestrear datos sobre la variabilidad espacial (vertical y horizontal) y temporal de las corrientes. Se pueden obtener perfiles de velocidad de profundidad absoluta de alta calidad utilizando LADCP (de forma aislada o junto con una sonda CTD). Su uso en combinación con un ADCP a bordo de una embarcación o un ADCP secundario apuntando hacia arriba mejora la calidad de los datos obtenidos (Thurnherr *et al.*, 2010).

62. Un ADCP a bordo de una embarcación recoge datos sobre la distribución espacial de las corrientes a profundidades de hasta 1.600 m, dependiendo de las especificaciones del ADCP utilizado. Sin embargo, existe un gran error de medición en el caso de las mediciones a gran distancia (800 m y 1.600 m respectivamente). Para conseguir una mejor resolución en los 100-200 m superiores, debería utilizarse una combinación de dos ADCP a bordo (por ejemplo, OS75 o OS38 con OS150 o WH300) (Firing y Hummon, 2010).

63. Los amarres con ADCP (u otros correntómetros) deben utilizarse para estudiar la variabilidad temporal de las corrientes y otras características de la columna de agua. Los amarres deben estar desplegados durante un mínimo de 12 a 13 meses (para cubrir un ciclo anual); Los despliegues más largos proporcionan mejor información. El número de ADCP (u otros correntómetros) debe ser suficiente para garantizar una cobertura detallada de los 200 m más cercanos al fondo. Se recomienda encarecidamente el uso de ADCP adicionales (u otros correntómetros) en las capas superficiales, intermedias y abisales.

64. En la literatura publicada, se pueden encontrar recomendaciones sobre los LADCP (Thurnherr *et al.*, 2010), los ADCP a bordo (Firing y Hummon, 2010), los ADCP remolcados y los ADP (Sgih *et al.*, 2001).

65. En los amarres deberán colocarse trampas de sedimentos y otros equipos pertinentes para obtener datos sobre la variabilidad temporal de otras características del agua y la sedimentación.

66. Además, deben desplegarse flotadores y boyas de deriva para estudiar la variabilidad temporal de las corrientes a profundidades adecuadas.

### **C. Variable medida: temperatura y salinidad**

67. Para caracterizar las condiciones físicas de la columna de agua, se debe elaborar un perfil de la columna de agua con una sonda CTD, o bien utilizar sensores acoplados a un ROV, AUV o planeador submarino. El agua de mar debe describirse siguiendo la norma TEOS-10. Además de una configuración normalizada para medir la presión (convertida en profundidad), la conductividad (convertida en salinidad) y la temperatura, cualquier muestreo de CTD debe complementarse con el uso de sensores adicionales para otros parámetros cuando sea posible (para determinar, por ejemplo, la turbidez, el oxígeno disuelto, el pH, la fluorescencia, la radiación fotosintéticamente activa, los nitratos y la altimetría). El Grupo de Datos e Información del CIEM (2006) ofrece consideraciones claves sobre la recopilación de datos de CTD de calidad y las normas sobre datos.

68. Las sondas CTD o los sensores apropiados pueden montarse en cables, boyas de deriva o flotadores, amarres o boyas o plataformas sobre el fondo, o utilizarse como sondas CTD para barcos en movimiento. Una sonda CTD para barcos en movimiento es la que se lanza desde un lanzador portátil o fijo y se recupera enrollando el hilo en el carrete mientras el barco mantiene su rumbo y velocidad.

69. Las mediciones mediante teledetección por satélite deben utilizarse para obtener información sobre los parámetros oceanográficos a escala temporal sinóptica. Además de la temperatura y la salinidad de la superficie, los satélites pueden medir la distribución del hielo marino, la altura de las olas, la altura de la superficie, la retrodispersión de la señal de radar y el color del océano. Se puede encontrar una gran cantidad de información sobre satélites y conjuntos de datos en los sitios web de la NASA (en particular, el Physical Oceanography Distributed Active Archive Center del Jet Propulsion Laboratory), la NOAA, la AEE, el JAXA y el programa Copérnico.

70. Las boyas, los amarres, las boyas de deriva y los flotadores pueden estar equipados con sensores para medir la temperatura de la superficie del mar, la temperatura del agua del mar, la presión de la superficie del mar, la salinidad de la superficie del mar, la salinidad del agua del mar, la velocidad del viento, la concentración de oxígeno disuelto, la fluorescencia y el color del océano, la temperatura de la capa de mezcla y la presión parcial del dióxido de carbono disuelto ( $p\text{CO}_2$ ). Pueden utilizarse para recoger información biológica (por ejemplo, sobre la dispersión de las larvas de peces) y para estudiar las corrientes y las olas del océano. Las consideraciones fundamentales sobre la recogida de datos de calidad de las boyas, las normas relativas a los datos y el procesamiento de los datos se recogen en los documentos del Grupo de Cooperación sobre Boyas de Acopio de Datos, el equipo de gestión de datos de boyas de deriva del Ifremer y la comunidad del programa Argo.

#### **D. Variable medida: corrientes**

71. Las corrientes deben determinarse utilizando tanto métodos eulerianos (medición de series cronológicas de la velocidad y la dirección de la corriente en un lugar fijo) como métodos lagrangianos (se observa la trayectoria seguida por cada partícula de fluido en función del tiempo), a fin de permitir una visión global. Para los métodos eulerianos, se pueden utilizar correntómetros mecánicos o no mecánicos. Los protocolos y metodologías del proyecto FixO3 deben utilizarse para los amarres y otros tipos de sistemas eulerianos (Coppola *et al.*, 2016). En el caso de los métodos lagrangianos, se pueden utilizar boyas de deriva superficiales, flotadores subsuperficiales, boyas de deriva *pop-up* o flotadores *pop-up*. Las imágenes de satélite de la temperatura y el color de la superficie del mar pueden utilizarse como pseudoboyas de deriva para estudiar las corrientes superficiales, partiendo de la base de que todos los desplazamientos de los elementos superficiales que se ven en las imágenes están causados por la advección de la corriente superficial. En Thomson y Emery (2014) se puede encontrar una breve revisión y referencias a todas las metodologías, incluidas las ventajas y desventajas de cada una.

72. Los datos obtenidos deben utilizarse para preparar y validar un modelo numérico de circulación. Junto con un modelo de transporte de sedimentos adecuado, el modelo numérico de circulación integrará los efectos de la agregación y la desagregación de partículas y podrá utilizarse para comprender la posible dispersión de los penachos operacionales y de descarga.

73. Cualquier modelo utilizado debe ser uno que los expertos en la elaboración de modelos oceánicos consideren adecuado para estudiar la dispersión cerca del fondo marino y, más generalmente, en toda la columna de agua. A fin de encontrar un modelo adecuado, se puede usar un examen de los códigos lagrangianos para el seguimiento de partículas en línea y sin conexión que incluye referencias a la literatura pertinente, en Van Sebille *et al.* (2018) y Numerical Models (2000).

74. Un paso importante en el análisis de los datos de las corrientes es su representación gráfica. Joseph (2014) explica cómo se puede lograr ese objetivo tanto para los datos medidos como para los modelados.

75. Los parámetros que deben medirse dependen del equipo utilizado. Sin embargo, deben incluirse la magnitud y la dirección de la velocidad de la corriente, los componentes de la velocidad zonal y meridional y la velocidad vertical.

76. A partir de esas mediciones, se debe caracterizar el régimen de corrientes de la columna de agua y, en particular, de la capa que va desde la capa límite del fondo hasta los 200 m por encima del fondo marino. Los análisis deben incluir la estructura del campo, las variaciones espaciales de la velocidad y dirección de la corriente (prestando especial atención a las zonas de geomorfología compleja) y las variaciones temporales de la velocidad y la dirección de la corriente. La variabilidad temporal debe caracterizarse de forma diurna, estacional e interanual; se deben registrar los acontecimientos episódicos como las tormentas y las corrientes de turbidez.

## **E. Variable medida: mareas y olas**

77. Las mareas deben medirse mediante sensores de presión en amarres fijos o mediante altimetría por satélite. Aunque los instrumentos oceanográficos modernos instalados en amarres fijos pueden resolver las variaciones de presión hasta una fracción de milímetro a máxima profundidad oceánica, para realizar mediciones precisas de la profundidad requieren una corrección de la temperatura e información sobre la deriva del sensor de presión (aproximadamente 1 cm al año). El uso de sensores de presión dobles ayuda a corregir esa deriva. Los manuales de la COI describen las mediciones del nivel del mar y su interpretación. La altimetría por satélite puede utilizarse para determinar las mareas calculando la variabilidad de la superficie del mar a partir de pases repetidos del radar satelital. Los datos de altimetría (incluidos los datos de Topex/Poseidon, Jason-1, ERS-1 y ERS-2, Envisat y Doris) y los programas informáticos y los manuales pertinentes están disponibles en el sitio web de Aviso+ ([www.aviso.altimetry.fr](http://www.aviso.altimetry.fr)).

78. Debe utilizarse cualquier método comúnmente aceptado para determinar las mediciones de las olas de gravedad en la superficie, como la altimetría por satélite, las boyas de oleaje con acelerómetros, los medidores de oleaje (incluidos los de resistencia, los de capacitancia y los manómetros de oleaje) y los radares de apertura sintética por satélite.

79. Los parámetros que deben medirse son los datos de presión o de nivel del mar, dependiendo de si se utilizan amarres fijos o altimetría por satélite.

80. A partir de esas mediciones, deben determinarse la amplitud y el período de las mareas, los principales constituyentes y la divergencia de las mareas, así como la altura y la dirección de las olas.

## **F. Variable medida: turbulencia**

81. La estimación de la intensidad de la turbulencia debe hacerse por métodos directos o indirectos utilizando datos de una sonda de cizalladura de la velocidad, una sonda CTD, un ADCP, un ADV o un DCP (Thorpe, 2007).

82. Las observaciones para determinar la intensidad de la turbulencia deben realizarse lo más cerca posible del fondo marino. Dado que la turbulencia potenciada por el fondo generalmente se propaga hacia arriba a través de la capa límite del fondo, las mediciones de campo deben realizarse hasta el interior del océano y deben incluir toda la capa límite del fondo. La turbidez cerca del fondo está estrechamente relacionada con la intensidad de la turbulencia. Por consiguiente, las mediciones de turbulencia deben combinarse con la investigación de la turbidez (véanse los párrafos 85 a 96). Cuando se utiliza el método directo, se recomienda utilizar una sonda de

microestructura de perfilado horizontal acoplada a un AUV para obtener la distribución espacial de la intensidad de la turbulencia. Si se utiliza el método de la escala de Thorpe, el muestreo con sonda CTD debe realizarse con mucha precisión, lo más cerca posible del fondo. Si se utiliza el método Doppler acústico, el amarre del medidor de corrientes debe colocarse en el fondo del mar.

83. Los parámetros que deben medirse dependen de la metodología empleada:

a) Para la medición directa: cizalladura de la velocidad a microescala, descenso de la velocidad del instrumento, aceleración lateral del instrumento y temperatura de alta resolución;

b) Para la medición indirecta: temperatura, conductividad, presión y velocidad.

84. A partir de esas mediciones, deben determinarse la tasa de disipación de la energía cinética turbulenta, la densidad, la frecuencia de flotabilidad, el perfil de velocidad vertical, las fluctuaciones térmicas de la microestructura, la difusividad turbulenta vertical, las escalas de Thorpe y las tasas de disipación de la temperatura.

## **G. Variable medida: propiedades ópticas**

85. Las propiedades ópticas del agua de mar pueden dividirse en propiedades ópticas aparentes y propiedades ópticas inherentes, como se indica a continuación:

a) Las propiedades ópticas aparentes dependen de la naturaleza del agua de mar, junto con el material disuelto y las partículas, y de la distribución angular (geometría) de la radiación solar, y deben medirse mediante espectrorradiómetros en los que se utiliza un monocromador variable para separar la luz en determinadas bandas de onda;

b) Las propiedades ópticas inherentes dependen de la longitud de onda de la luz y del medio acuático, pero son independientes del campo luminoso ambiental y de su distribución angular, y deben medirse mediante medidores de atenuación de haces monocromáticos (transmisómetros), espectrómetros de absorción y atenuación, sensores de dispersión (o retrodispersión), células capilares de guías de ondas líquidas, instrumentos de difracción láser o citometría de flujo.

86. Las propiedades ópticas deben obtenerse utilizando uno de los siguientes métodos:

a) Muestreo físico a bordo en las estaciones (perfilado y muestreo verticales, mediciones radiométricas manuales o con dispositivos amarrados) o en embarcaciones en movimiento (mediciones radiométricas a bordo, manuales o con dispositivos amarrados, muestreo mediante sistemas de flujo o dispositivos ondulantes o de profundidad fija remolcados o cadenas con los sensores adecuados);

b) Mediciones desde AUV, planeadores submarinos, plataformas eulerianas fijas (amarres, trípodes de fondo y otras plataformas sobre el fondo) o dispositivos lagrangianos (boyas de deriva y flotadores);

c) Teledetección desde plataformas a bordo, aéreas o satelitales. Las mediciones de este tipo pueden ser pasivas (el sol es la fuente de iluminación) o activas (se utiliza una señal de la plataforma del sensor como fuente; generalmente se aplica iluminación láser).

87. Además, las propiedades ópticas deben determinarse utilizando modelos inversos (véase Werdell *et al.*, 2018, para más detalles) o modelos bioópticos (véase Ogashawara, 2015, para más detalles).

88. Se pueden utilizar diversos tipos de fluorómetros para medir la fluorescencia, la fotoemisión o la bioluminiscencia (y pueden servir como complemento a los métodos acústicos modernos de estimación de la biomasa). Se pueden encontrar más detalles sobre cada uno de ellos en Moore *et al.* (2009) y sus referencias. Los sensores para medir la turbidez (nefelómetros y sensores de retrodispersión acústica) pueden configurarse de diversas maneras y existen numerosos métodos y normas de configuración para ellos (por ejemplo, la norma ISO 7027). Véase también Petihakis *et al.*, 2014; y Tamburri, 2006. La teledetección de la fluorescencia y la bioluminiscencia también puede utilizarse para medir la fluorescencia del plancton desde los satélites (por ejemplo, Erickson *et al.*, 2019).

89. Para poder evaluar cualquier exceso de concentración de partículas en suspensión en los penachos operacionales y de descarga, los datos de turbidez óptica o acústica deben convertirse en concentración de partículas en suspensión. Con ese objetivo, los sensores ópticos o acústicos deben calibrarse en función de las partículas en suspensión presentes localmente en la columna de agua. En el caso de los estudios de referencia, es necesario remitirse a la concentración de partículas en suspensión determinada en las muestras de agua tomadas junto con las mediciones de la turbidez. Para el seguimiento de los penachos operacionales y de descarga, se puede seguir el mismo sistema si se pueden tomar muestras de agua directamente del penacho. De lo contrario, los sensores deben calibrarse *ex situ* en suspensiones preparadas con agua de mar local filtrada y material básico del penacho.

90. El método 180.1 de la EPA y la norma ISO 7027 están reconocidos internacionalmente para verificar el rendimiento del turbidímetro y del sensor de turbidez y el cumplimiento del método.

91. Los instrumentos que siguen el método 180.1 de la EPA son adecuados para medir niveles de turbidez entre 0 NTU y 40 NTU. Estos turbidímetros deben tener una resolución mínima de 0,02 NTU en aguas con una turbidez inferior a 1 NTU.

92. La norma ISO 7027 especifica dos métodos cuantitativos para utilizar los nefelómetros: la nefelometría (para medir la radiación difusa, aplicable a aguas de baja turbidez) y la turbidimetría (para medir la atenuación de un flujo radiante, más aplicable a aguas de alta turbidez). La turbidez resultante medida según el primer método suele oscilar entre 0,05 NTU o menos y 400 NTU. Dependiendo del diseño del instrumento, la nefelometría también puede aplicarse a aguas de mayor turbidez. NTU y FNU son numéricamente equivalentes.

93. La turbidez medida por el segundo método se expresa en FAU, y los resultados suelen oscilar entre 40 FAU y 4.000 FAU.

94. En función de la metodología, los parámetros que deben medirse son la radiancia, la irradiancia, la irradiancia escalar, el coeficiente de atenuación difusa de la luz y el coeficiente de atenuación de la irradiancia escalar, la radiación fotosintética disponible, la reflectancia de la irradiancia, la reflectancia de la radiancia, el coeficiente de absorción, el coeficiente de dispersión, el coeficiente de atenuación del haz, la función de dispersión del volumen, el color del océano, la fluorescencia, la bioluminiscencia, la transparencia y la turbidez.

95. A partir de esas mediciones, deben determinarse: la clorofila a y otros pigmentos, la visibilidad, el volumen de sedimentos en suspensión, la biomasa de fitoplancton, la concentración de carbono orgánico disuelto y particulado y la productividad en forma de carbono orgánico particulado, así como la composición de las especies (para detectar la proliferación de algas nocivas y ver el análisis de nitratos) (véanse también las secciones V.H y VII.D).

96. Además, las mediciones ópticas pueden utilizarse para validar y calibrar las mediciones de teledetección.

## H. Variable medida: ruido

97. Deben determinarse dos características del ruido en una amplia gama de frecuencias (1 Hz a 20 kHz): los niveles espectrales de ruido (diferenciando el ruido impulsivo y el ruido ambiente) y la propagación del sonido. Los mecanismos fundamentales, las mediciones y la modelización numérica del ruido ambiente oceánico pueden consultarse en Carey y Evans (2011) y Robinson *et al.* (2014). Las mediciones del ruido pueden realizarse desde barcos (en estaciones o en movimiento), AUV, planeadores submarinos, flotadores, boyas de deriva, amarres, boyas, plataformas sobre el fondo y trípodes. Hay que tener en cuenta que algunos otros sensores generan ruido. Por consiguiente, los trípodes de hidrófonos individuales o las baterías de hidrófonos deben conectarse a cierta distancia de la plataforma del instrumento para reducir el ruido. La velocidad del sonido debe medirse directamente (con la ayuda de un medidor o sensor de velocidad del sonido) o debe obtenerse a partir de la temperatura, la salinidad (conductividad) y la presión medidas con una sonda CTD (véanse los párrafos 67 a 70). El método para obtener la velocidad del sonido se describe en Wong y Zhu (1995).

98. Deben medirse los siguientes parámetros: niveles espectrales de ruido y, posiblemente, velocidad del sonido.

99. A partir de esas mediciones, deben determinarse: los niveles de ruido ambiente en los perfiles verticales a lo largo de la columna de agua desde la superficie del mar hasta el fondo marino, la variabilidad temporal de los niveles de ruido ambiente, las profundidades del canal de determinación y medición de la distancia del sonido y la velocidad del sonido (si no se mide directamente).

## I. Calidad de los datos

100. Las técnicas de análisis, incluidos los métodos estadísticos, que deben utilizarse para obtener, procesar y presentar los datos, resolver los errores y analizar los campos de datos geoespaciales y las series cronológicas de esos métodos y técnicas pueden encontrarse en Thomson y Emery (2014).

101. Para obtener datos de la máxima calidad, deben aplicarse correcciones a los sensores de CTD. Los procedimientos de calibración varían de un laboratorio a otro, pero en general se acepta que —mientras que los sensores de presión y temperatura pueden someterse a calibraciones previas y posteriores al crucero en el laboratorio— el sensor de conductividad se calibra mejor por comparación con las muestras recogidas para el análisis de la salinidad (Grupo de Datos e Información del CIEM, 2006); Petihakis *et al.*, 2014, e información y manuales proporcionados por los fabricantes) y la norma sobre el agua de mar de la AICFO.

102. Para el control de calidad de los datos de CTD, debe utilizarse la información del EuroGOOS DATA-MEQ Working Group (2010), la COI (2010) o el Sistema Integrado de Observación de los Océanos de los Estados Unidos (2020a, 2020b).

103. Para el control y la corrección de la calidad de los datos relacionados con los AUV y los planeadores submarinos, consúltense Allen *et al.* (2018, 2020), Sistema Integrado de Observación de los Océanos de los Estados Unidos (2016) y Woo (2011). Para la gestión de los datos, consúltese EGO Gliders Data Management Team (2020).

104. Para las mediciones de la temperatura y la salinidad de la superficie del mar, deben consultarse Le Menn *et al.* (2019) y Grupo de Cooperación sobre Boyas de Acopio de Datos (2011).

105. Para más información sobre los distintos tipos de boyas de deriva y flotadores, las oportunidades y las ventajas de su uso, las limitaciones y las innovaciones, véase Lumpkin *et al.* (2017).

106. Los valores de temperatura deben convertirse en temperatura posible, teniendo en cuenta el efecto de la presión hidrostática. La densidad (densidad posible) debe calcularse indirectamente a partir de la salinidad, la temperatura (temperatura posible) y la presión utilizando la ecuación de estado (TEOS-10).

107. Se puede encontrar orientación sobre el control de calidad de los datos de los ADCP en Sistema Integrado de Observación de los Océanos de los Estados Unidos (2019a) y EuroGOOS DATA-MEQ Working Group (2010). La información sobre la corrección y el procesamiento de los datos de los amarres (ADCP, RCM, Microcat) puede encontrarse en Karstensen (2005).

108. La calibración es crucial para medir con precisión el ruido. Deben consultarse las siguientes directrices y publicaciones: Biber *et al.* (2018) (para los detalles sobre la calibración) y Robinson *et al.* (2014), y Sistema Integrado de Observación de los Océanos de los Estados Unidos (2017) (para el control de calidad).

109. Cualquier modelo debe ser validado.

110. La resolución espacial de los radiómetros modernos es de 1 km (AVHRR), pero solo funcionan cuando no hay nubes. Los sensores pasivos de microondas pueden utilizarse para observar incluso en condiciones de nubosidad, porque utilizan longitudes de onda más largas (6-12 GHz), pero tienen una resolución espacial mucho más pobre (25-50 km) (Talley *et al.*, 2011). Los radiómetros de microondas pueden utilizarse para medir la salinidad de la superficie del mar con una resolución espacial de 50-100 km a escalas temporales de una semana o un mes, respectivamente (Talley *et al.*, 2011; y Thomson y Emery, 2014). Además de la temperatura y la salinidad de la superficie, los satélites pueden medir la distribución del hielo marino, la altura de las olas, la altura de la superficie, la retrodispersión de la señal de radar y el color del océano. Se puede encontrar más información sobre la teledetección por satélite en la literatura (por ejemplo, Stewart, 1985; Robinson, 2004; y COI, 1992), los documentos del Grupo internacional de coordinación en relación con el color de los océanos y los Ocean Optics Protocols for Satellite Ocean Colour Sensor Validation.

111. En las últimas décadas se han acumulado grandes conjuntos de datos en el marco de diversos programas científicos internacionales. Se trata de datos de libre acceso que deben utilizarse para compararlos con los datos de referencia recogidos para garantizar la calidad. Cabe destacar los siguientes ejemplos:

a) Experimento Mundial sobre la Circulación Oceánica 1990-2002 ([www.nodc.noaa.gov/woce/wdiu](http://www.nodc.noaa.gov/woce/wdiu));

b) Datos de flotadores subsuperficiales del Experimento Mundial sobre la Circulación Oceánica ([www.aoml.noaa.gov/phod/float\\_traj/index.php](http://www.aoml.noaa.gov/phod/float_traj/index.php));

c) World Ocean Database ([www.nodc.noaa.gov/OC5/WOD/pr\\_wod.html](http://www.nodc.noaa.gov/OC5/WOD/pr_wod.html));

d) Global Temperature and Salinity Profile Programme: ([www.nodc.noaa.gov/GTSPP](http://www.nodc.noaa.gov/GTSPP));

e) SeaDataNet ([www.seadatanet.org](http://www.seadatanet.org));

f) Coriolis Ocean Database for Reanalysis ([www.coriolis.eu.org/Data-Products/Products/CORA](http://www.coriolis.eu.org/Data-Products/Products/CORA));

- g) Repositorio de datos Pangaea ([www.pangaea.de/?t=Oceans](http://www.pangaea.de/?t=Oceans));
  - h) Global Drifter Program, antes denominado Surface Velocity Program: ([www.aoml.noaa.gov/phod/gdp/index.php](http://www.aoml.noaa.gov/phod/gdp/index.php));
  - i) Global Ocean Currents Database ([www.ncei.noaa.gov/products/global-ocean-currents-database-gocd](http://www.ncei.noaa.gov/products/global-ocean-currents-database-gocd));
  - j) Flotadores Argo: página de inicio de Argo ([www.argo.ucsd.edu](http://www.argo.ucsd.edu)) y página de inicio del proyecto internacional Argo ([www.argo.net](http://www.argo.net)); Datos biogeoquímicos de los flotadores Argo (<https://biogeochemical-argo.org>);
  - k) Datos archivados de boyas de deriva, gestión integrada de datos científicos, Fisheries and Oceans Canada ([www.dfo-mpo.gc.ca/science/data-donnees/drib-bder/index-eng.html](http://www.dfo-mpo.gc.ca/science/data-donnees/drib-bder/index-eng.html))
- l) Además, pueden resultar útiles los siguientes atlas electrónicos:
    - i) World Ocean Atlas 2018 ([www.nodc.noaa.gov/OC5/woa18](http://www.nodc.noaa.gov/OC5/woa18));
    - ii) Electronic Atlas of World Ocean Circulation Experiment Data ([www.ewoce.org](http://www.ewoce.org)).

## J. Gestión de los datos

112. Los datos y metadatos se deben facilitar a la Autoridad como se indica en la sección III.E. Pueden obtenerse orientaciones adicionales para variables específicas en las referencias indicadas anteriormente.

## V. Oceanografía química y biogeoquímica

### A. Introducción

113. Es necesario conocer el entorno químico de la columna de agua y los sedimentos (es decir, el agua intersticial y la fracción sólida) para caracterizar las condiciones oceanográficas y biogeoquímicas de referencia y evaluar, en una fase posterior, tanto el impacto directo de la explotación minera en el fondo marino como el impacto indirecto debido a los penachos de sedimentos en suspensión que puedan producirse, incluido un posible recubrimiento del fondo marino y su efecto en los procesos de la columna de agua.

114. El desarrollo de los penachos de sedimentos en suspensión depende en gran medida de las futuras técnicas de extracción. Los penachos pueden desplazarse a grandes distancias (desde 1 km hasta decenas de kilómetros), pueden diferir del agua circundante en cuanto al tamaño de las partículas y la composición química y se reubicarán lejos de la fuente; por esa razón, pueden afectar a los ecosistemas pelágicos y bentónicos, sus funciones y los ciclos biogeoquímicos marinos en zonas más amplias.

115. La biogeoquímica de los sedimentos marinos se centra en los procesos y funciones del fondo marino. Se trata de combinar el estudio de las conversiones bioquímicas con la observación de los procesos biológicos, geoquímicos y geológicos implicados. Las observaciones se centran en los procesos bentónicos vinculados a la remineralización de la materia orgánica exportada desde las aguas superficiales en una cascada de reacciones de oxidación-reducción. Las mediciones se basan principalmente en los resultados del muestreo de sedimentos y la posterior extracción por capas del agua intersticial y las submuestras de la fase sólida para su análisis. En

algunos casos, como en los de las tasas de absorción de oxígeno y la distribución del pH, las mediciones deben obtenerse directamente en el fondo marino (es decir, *in situ*). En el caso de todas las variables del agua intersticial que se utilizarán posteriormente para cuantificar la liberación de agua intersticial y la dispersión del penacho, el muestreo adicional debe centrarse en el agua del fondo para elaborar una base de referencia que permita identificar la materia sólida o el agua intersticial liberadas como consecuencia de las alteraciones del fondo marino o del material descargado, y su efecto (es decir, la distribución, el transporte y la transformación de los reactivos y los productos de las reacciones).

116. Las variables químicas que deben medirse en la columna de agua, los sedimentos y el agua intersticial son las siguientes:

a) Nutrientes: la disponibilidad de macronutrientes inorgánicos ( $\text{NO}_3$ ,  $\text{NO}_2$ ,  $\text{NH}_4$ ,  $\text{PO}_4$ ,  $\text{Si(OH)}_4$ ) en la capa superior del océano limita y regula con frecuencia la cantidad de carbono orgánico fijado por el fitoplancton y constituye un mecanismo clave que controla la disponibilidad de materia orgánica en el fondo marino. Las concentraciones de nutrientes en el agua intersticial ( $\text{NO}_3$ ,  $\text{NO}_2$ ,  $\text{NH}_4$  y  $\text{PO}_4$ ) proporcionan información sobre el ciclo biogeoquímico de la materia orgánica y las condiciones de oxidación-reducción en diversas capas sedimentarias;

b) Oxígeno: las concentraciones de oxígeno en la columna de agua proporcionan información sobre la producción de materia orgánica en la capa superficial y su remineralización durante la exportación hacia el fondo marino. La distribución del oxígeno en los sedimentos, la profundidad de penetración del oxígeno y el flujo a través de la interfaz sedimento-agua son una medida de la remineralización de la materia orgánica bentónica y de la actividad de la comunidad bentónica. Además, la disponibilidad de oxígeno afecta a la movilidad de la mayoría de los metales;

c) Sistema de carbonatos: este sistema limita la producción primaria, la remineralización del carbono orgánico, la oxidación metálica en los penachos de sedimentos, la acidificación del océano, la desoxigenación en la columna de agua, la remineralización de la materia orgánica, las reacciones de oxidación-reducción secundarias y las reacciones inducidas entre el agua intersticial y los minerales de los sedimentos, todo lo cual afecta a las funciones ecosistémicas;

d) Metales traza: muchos metales traza son elementos esenciales para el mantenimiento de las funciones celulares en los microorganismos. Sin embargo, en concentraciones elevadas, estos elementos pueden provocar una toxicidad que depende del metal, de la especiación química y del organismo;

e) Materia orgánica e inorgánica: el aporte de materia orgánica al fondo marino es el motor clave de los procesos biogeoquímicos. Garantiza la presencia de alimentos para mantener la biomasa y la biodiversidad de los organismos bentónicos mediante la interacción con la red alimentaria bentónica. Las observaciones en la columna de agua se centran en la productividad y la exportación, mientras que las mediciones en el fondo marino sirven para cuantificar la cantidad y la calidad de la materia orgánica disponible para los organismos bentónicos, el ciclo biogeoquímico en el fondo marino y la dinámica del ciclo de la materia orgánica bentónica;

f) Trazadores de isótopos radiactivos (radiotrazadores): es necesario analizar los radioisótopos vinculados a la fase sólida del sedimento para caracterizar cuantitativamente la actividad de bioturbación en los sedimentos y determinar las tasas de sedimentación. La distribución de los radioisótopos naturales sirve de referencia para determinar los impactos directos de la minería en los sedimentos y la columna de agua (incluida la liberación de agua intersticial). Además, permite evaluar

los radioisótopos y, por tanto, la intensidad de la radiactividad natural en los nódulos una vez iniciada la extracción.

## B. Metodología general

117. En el caso de la mayoría de las variables químicas y biogeoquímicas, existen métodos aceptados por toda la comunidad que deben utilizarse para garantizar datos de alta calidad, exactos y precisos que sean comparables entre las distintas zonas de licencia y los distintos contratistas.

118. Los parámetros químicos de la columna de agua deben ser muestreados utilizando la más pertinente de las siguientes técnicas:

a) Muestreo con botellas de agua mediante sondeos de CTD realizados con la ayuda de ROV: para nutrientes, oxígeno, sistema de carbonatos, metales traza (utilizando botellas CTD o Go-Flo limpias de metales traza), materia orgánica disuelta y partículas en suspensión, incluida la materia orgánica particulada. Los sensores químicos electroquímicos y ópticos pueden utilizarse para obtener datos continuos e información básica sobre las propiedades químicas, pero no deben sustituir a la recogida de muestras discretas de agua para realizar análisis químicos de alta precisión y calidad;

b) Bombas *in situ* para la actividad radioisotópica, los metales traza y las concentraciones de partículas en suspensión;

c) Trampas de sedimentos amarradas y ancladas para las concentraciones de partículas y los flujos de partículas;

d) Datos biogeoquímicos de Argo para el pH, el nitrato y el oxígeno, entre otros.

119. Mientras que las estaciones de CTD, los despliegues de bombas *in situ* y las trampas de sedimentos ancladas requieren un trabajo estático, lo que limita la flexibilidad de la adquisición de datos, las trampas de sedimentos ancladas deben desplegarse en la columna de agua durante un máximo de dos años para realizar observaciones completas en el tiempo. Además, deben utilizarse flotadores autónomos, boyas de deriva y dispositivos similares equipados con sensores químicos, bioquímicos y ópticos para obtener datos espaciales y temporales sobre las variables químicas.

120. Las muestras para analizar los sedimentos y el agua intersticial deben obtenerse utilizando un sacatestigos múltiple, un sacatestigos de empuje manipulado mediante un ROV o un equipo fiable similar para los decímetros superiores de los sedimentos, y un sacatestigos de gravedad para las muestras más profundas. Para el muestreo biogeoquímico y químico-oceanográfico, deben consultarse las publicaciones sobre métodos del Programa de Descubrimiento Oceánico Internacional (antes llamado Programa Integrado de Perforaciones Oceánicas 2003-2013), Go-Ship y la iniciativa Geotraces (que se centra en la columna de agua), a fin de conocer los métodos comúnmente aceptados y acordados de muestreo químico-oceanográfico y biogeoquímico, junto con las publicaciones del repositorio del Sistema de Mejores Prácticas Oceánicas (alojado por IODE, que forma parte de la COI), así como las variables oceánicas esenciales definidas por el GOOS.

121. El agua intersticial debe extraerse directamente después de recuperar los testigos, utilizando métodos adecuados para cada variable; además, en la medida de lo posible, deben determinarse tantas variables biogeoquímicas como sea posible a partir de las mismas muestras de agua intersticial. El proceso de extracción del agua intersticial debe llevarse a cabo en un plazo de dos horas tras la recogida. En el caso

de algunos componentes disueltos que se espera que cambien con bastante lentitud (por ejemplo, el fosfato y el ácido silícico), las muestras de agua intersticial pueden almacenarse a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  o  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  hasta que se lleven a tierra para su análisis. Los testigos sedimentarios no investigados en relación con el agua intersticial pueden almacenarse a  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  o menos temperatura (antes de tomar submuestras de cada capa de sedimento). En el caso de algunos componentes delicados (por ejemplo, los nutrientes), el análisis del agua intersticial debe realizarse a bordo lo antes posible tras extraer el agua intersticial de los sedimentos, mientras que otros análisis pueden realizarse en el laboratorio en tierra sobre muestras transportadas congeladas o refrigeradas y conservadas adecuadamente.

122. Dado que los procesos biogeoquímicos y los flujos de solutos a través de la interfaz sedimento-agua se ven afectados por las condiciones del agua suprayacente, el agua suprayacente al sedimento en el revestimiento del testigo siempre debe muestrearse, por tratarse del componente del agua marina que limita con el agua intersticial. Como la muestra puede alterarse durante la recuperación o la manipulación, debe compararse con las muestras de la columna de agua más profunda obtenidas mediante la sonda CTD.

123. Los sedimentos subóxicos y el agua intersticial deben muestrearse en una cámara con guantes y en una atmósfera sin oxígeno (es decir, la cámara está llena de un gas inerte, por ejemplo, nitrógeno o argón) para preservar la especiación de los metales y otras variables sensibles a la oxidación-reducción.

124. A continuación se ofrecen referencias a las mejores prácticas actuales para cada variable, con indicaciones de los casos en los que se requieren modificaciones para garantizar la pertinencia para los fines de la minería de aguas profundas. Si aún no existe una mejor práctica generalizada (por ejemplo, el fraccionamiento de los coloides o las nanopartículas para analizar los metales traza), se recomienda una metodología y se proporcionan referencias a las publicaciones científicas más avanzadas. El GOOS ([www.goosocean.org](http://www.goosocean.org)) es un sistema de colaboración permanente para la observación de los océanos, que comprende redes *in situ*, sistemas satelitales, gobiernos, organismos del sistema de las Naciones Unidas y científicos particulares; la mayoría de las variables forman parte de las variables oceánicas esenciales definidas por el GOOS.

125. Dado que los métodos pueden estar sujetos a cambios (debido a nuevos avances tecnológicos, por ejemplo), deben utilizarse repositorios de mejores prácticas en línea para encontrar las actualizaciones de la metodología. El repositorio del Sistema de Mejores Prácticas Oceánicas (<https://repository.oceanbestpractices.org>) se recomienda como centro de búsqueda y localización de las mejores prácticas vigentes en materia de investigación, observación y gestión de datos e información oceánicos. Se trata de un repositorio digital permanente de libre acceso de las mejores prácticas comunitarias en ciencias y aplicaciones relacionadas con los océanos. Su mantenimiento corre a cargo de IODE, que forma parte de la COI.

### C. Resolución del muestreo

126. Los datos archivados de altimetría por satélite de teleobservación y de temperatura de la superficie del mar, los datos de color del océano y los datos hidrográficos disponibles en los repositorios de datos deben utilizarse para estimar de manera aproximada las variaciones espaciales y temporales previstas de las características oceanográficas superficiales que controlan la productividad primaria dentro de una zona de licencia. La información debe combinarse con la información sobre los procesos oceánicos y atmosféricos con el fin de determinar la estrategia de muestreo temporal y espacial adecuada para los parámetros químicos de la columna

de agua dentro de una región determinada, a fin de abarcar zonas con diferente productividad primaria y características oceanográficas cambiantes. Deben establecerse al menos una estación CTD y dos trampas de sedimentos (una instalada cerca del fondo marino y otra a unos 500 m por encima del fondo marino) en la columna de agua situada sobre la zona de extracción prevista dentro de la zona del contrato (incluida la zona de referencia para los efectos) y la zona de referencia para la preservación. El muestreo de CTD y el muestreo con trampas automatizadas deben llevarse a cabo de manera repetida en estas estaciones para resolver la variabilidad temporal. Además, deben obtenerse perfiles perpendiculares en toda la zona de licencia, y las estaciones de CTD deben estar espaciadas regularmente a distancias de unos 100 km.

127. Para las mediciones de la columna de agua, las muestras deben tomarse en toda la columna de agua, asegurándose de que se caracterizan todas las zonas detectadas mediante los datos oceanográficos físicos (véase la sección IV) (por ejemplo, la capa de mezcla de la superficie, la picnoclina, toda la zona de mínimo oxígeno y las masas de agua oceanográficas individuales en la termoclina y las regiones de aguas intermedias y profundas).

128. Como se indica en el párrafo 22, se recomienda una mayor resolución de muestreo vertical cerca del fondo marino, ya que ese abarca el espacio vertical previsto para la dispersión del penacho operacional y, además, es la profundidad más probable para la dispersión del penacho de descarga. Si la profundidad del penacho de descarga aún no se ha determinado en el momento de los estudios de referencia, deberán caracterizarse todas las posibles profundidades de descarga.

129. La adquisición de datos integrada con el muestreo de agua mediante sondas CTD, el bombeo *in situ* y el despliegue de trampas de sedimentos deben realizarse lo más cerca posible del fondo marino. Para evaluar los flujos bentónicos naturales (de metales) desde el sedimento al agua de fondo suprayacente, el muestreo debe realizarse lo más cerca posible del fondo marino. Además de los muestreos puntuales con una sonda CTD, debe haber despliegues a largo plazo de muestreadores pasivos a lo largo de un gradiente vertical desde el fondo marino hasta 10 m por encima del fondo.

130. El muestreo debe llevarse a cabo con el mismo dispositivo de muestreo y al mismo tiempo siempre que sea posible (véase la sección III.C) y debe seguir un sistema de muestreo estratificado anidado. Se aplican las consideraciones generales para abarcar la variabilidad espacial y temporal (véase la sección III.A). A continuación se ofrecen más detalles sobre las distintas variables.

#### **D. Variable medida: nutrientes**

131. El conjunto de mejores prácticas recomendado para determinar los macronutrientes inorgánicos disueltos ( $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{NO}_2^-$ ,  $\text{PO}_4^{3-}$  y  $\text{Si}(\text{OH})_4$ ) tanto en la columna de agua como en el agua intersticial está documentado en el manual revisado de Go-Ship de Becker *et al.* (2019) y en los protocolos normalizados de Gieskes *et al.* (1991), y Grasshoff *et al.* (1999). Las mediciones deben realizarse utilizando métodos de análisis de flujo continuo o segmentado con material de referencia certificado o material de referencia para nutrientes en el agua de mar, a fin de garantizar el control de calidad durante el análisis.

132. Incluso con equipos de alta precisión, la cuantificación del amonio en el agua intersticial de las profundidades es difícil debido a las bajísimas concentraciones. Por tanto, cuando las concentraciones resulten estar cerca del límite de detección, se puede omitir la determinación del amonio del agua intersticial hasta que se disponga

de mejores métodos analíticos. El ácido silícico en el agua intersticial de las profundidades no tiene un alto potencial diagnóstico para la determinación del sistema geoquímico bentónico y, por tanto, también puede omitirse en las observaciones de referencia.

133. Las concentraciones de nutrientes, especialmente de nitrato y nitrito, deben determinarse inmediatamente después del muestreo o analizarse en el plazo de una o dos semanas si, tras la recogida, las muestras de agua y agua intersticial se congelan inmediatamente a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

134. La metodología que debe utilizarse para determinar el contenido de nitratos y nitritos en el agua de mar y el agua intersticial (y, simultáneamente, las concentraciones de fosfato y ácido silícico mediante el análisis de flujo segmentado) es la siguiente:

a) Deben analizarse unos pocos mililitros de agua no tratada recién extraída (o recién descongelada) o de agua intersticial, normalmente con una dilución doble (agua) o triple (agua intersticial), mientras el sistema de análisis de flujo segmentado se enjuaga constantemente con nitrógeno;

b) Las concentraciones totales de  $\text{NO}_x$  (nitrato + nitrito) se determinarán coloriméricamente a 520-540 nm tras la reducción del nitrato a nitrito a pH 8 utilizando una bobina de cadmio encobrado;

i) El contenido de nitrito se mide por separado de forma colorimétrica a 520-540 nm tras su reacción con la sulfanilamida en medio ácido;

ii) Las concentraciones de nitrato se determinan restando la concentración de nitrito medida de los valores totales de  $\text{NO}_x$ .

c) El contenido de fosfato debe determinarse coloriméricamente a 820 nm (sulfato de dihidracina) o a 880 nm (ácido ascórbico) mediante el método del azul de molibdeno;

d) Las concentraciones de ácido silícico deben determinarse coloriméricamente a 660 nm (cloruro de estaño) u 820 nm (ácido ascórbico) como complejo de molibdato de sílice.

135. Los datos deben indicarse en mol/l (o nmol/l,  $\mu\text{mol/l}$  o mmol/l, según el rango de concentración específico del constituyente) y los datos de la fase sólida, en mg/kg o en porcentaje de peso. Los datos deben comunicarse siempre con información en blanco (si procede), los límites de cuantificación y los resultados con respecto al material de referencia certificado o al material de referencia para nutrientes en el agua de mar. Cada muestra debe analizarse por duplicado o triplicado. La precisión analítica de cada muestra no debe superar el 5 % de desviación típica relativa. Las calibraciones para cada constituyente nutritivo del agua intersticial deben realizarse utilizando agua de mar estándar de la AICFO con al menos seis estándares. El coeficiente de determinación ( $r^2$ ) de cada curva de calibración debe ser superior a 0,98. Las concentraciones medias de nutrientes deben calcularse a partir de mediciones por duplicado o triplicado y presentarse en forma de gráficos de profundidad. Debe indicarse la información sobre la calidad analítica (es decir, exactitud, precisión) durante la medición.

136. Los parámetros que deben medirse tanto en la columna de agua como en el agua intersticial son  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{NO}_2^-$  y  $\text{PO}_4^{3-}$ , mientras que las mediciones de  $\text{NH}_4^+$  y  $\text{Si}(\text{OH})_4$  se realizan solo en la columna de agua.

137. A partir de esas mediciones, se debe determinar la producción primaria (solo en la columna de agua), la tasa de respiración, la remineralización, la desoxigenación y

los flujos bentónicos, junto con la zonación de oxidación-reducción dentro de los sedimentos.

## E. Variable medida: oxígeno

138. La metodología que debe utilizarse para medir la distribución de oxígeno en la columna de agua se describe en Langdon (2010), McTaggart *et al.* (2010) y Uchida *et al.* (2010). Se debe consultar Bittig *et al.* (2018) para ver una revisión de los optodos. Un método automatizado de laboratorio que puede utilizarse, con apoyo de programas informáticos, es el establecido por el Oceanographic Data Facility del Instituto Scripps de Oceanografía (<https://scripps.ucsd.edu/ships/shipboard-technical-support/odf/chemistry-services/dissolved-oxygen>).

139. Las observaciones del oxígeno en el fondo marino deben abarcar tanto las mediciones del consumo de oxígeno como la profundidad de penetración del oxígeno en los sedimentos. Las mediciones de consumo se centran en la capa superior de los sedimentos y deben realizarse *in situ* (es decir, directamente en el fondo marino). Las mediciones de la distribución de oxígeno a lo largo de la columna de sedimentos deben obtenerse en el laboratorio a partir de testigos recuperados obtenidos con sacatestigos múltiples (para los decímetros superiores) y sacatestigos de gravedad para determinar la profundidad de penetración, (es decir, la profundidad a la que la concentración de oxígeno desciende a cero) (por ejemplo, Mewes *et al.*, 2014). El oxígeno debe medirse con sensores, ya sean sensores ópticos de oxígeno (optodos) o electrodos de tipo Clark, para poder realizar mediciones con la resolución espacial requerida y evitar el riesgo de contaminación con oxígeno atmosférico asociado a los métodos basados en muestreos. Deben utilizarse microsensores (microelectrodos y optodos de fibra óptica) para registrar los perfiles verticales de la concentración de oxígeno en el agua intersticial. Deben utilizarse sensores ópticos más grandes y temporalmente más estables (macrooptodos) para medir series cronológicas de oxígeno en cámaras bentónicas o aguas de fondo. Los sensores deben calibrarse minuciosamente en el laboratorio y los registros obtenidos *in situ* deben validarse comparando las mediciones tomadas por encima de los sedimentos con las concentraciones del agua de fondo determinadas con los métodos antes mencionados.

140. Se espera una fuerte dinámica espacial y estacional en el caso de la captación de oxígeno del fondo marino, por lo que las mediciones *in situ* realizadas durante las expediciones con micromedidores o cámaras deben abarcar diferentes intervalos de tiempo en relación con los principales eventos de productividad y exportación (por ejemplo, proliferaciones de algas, picos en los flujos verticales e incidentes de deposición de fitodetritos). Para tener plenamente en cuenta la variabilidad estacional, esas mediciones deben complementarse con series cronológicas de mediciones de la captación de oxígeno realizadas de forma autónoma mediante repetidas elaboraciones de perfiles o incubaciones en cámara (véase más adelante) con plataformas móviles (vehículos orugas submarinos bentónicos) durante períodos más largos, de varios meses o a lo largo del año.

141. Las mediciones de la captación de oxígeno deben determinarse *in situ* utilizando cámaras bentónicas y microfiltros (Boetius y Wenzhöfer, 2013). Las incubaciones en cámara determinan la captación total de oxígeno, también denominada consumo de oxígeno de la comunidad sedimentaria, y los microfiltros miden la captación difusiva de oxígeno. Para medir la captación difusiva de oxígeno, los microsensores de oxígeno se introducen en los sedimentos en pequeños peldaños verticales mediante micromedidores. Para abordar plenamente la captación de oxígeno, las mediciones de oxígeno *in situ* deben incluir generalmente tanto la captación total como la difusora. Si la metodología y la cantidad en cuestión (es decir, la captación total de oxígeno o

la captación difusiva de oxígeno) son coherentes a lo largo de las observaciones de referencia, una de las dos cantidades se considera suficiente. Si solo se selecciona un sistema, se prefieren las mediciones de la captación total de oxígeno, ya que cubren toda la comunidad sedimentaria y abarcan la captación de oxígeno que tiene lugar en los nódulos y la respiración de la epifauna de los nódulos. Sin embargo, las mediciones de la captación difusiva de oxígeno, que se ocupan principalmente de la respiración microbiana, representan una alternativa aceptable, ya que la contribución de la fauna suele ser baja en los sedimentos de aguas profundas y se espera que la mayor parte de la respiración tenga lugar en los sedimentos y no en los nódulos.

142. El tiempo de despliegue para el análisis de la captación total de oxígeno debe ser lo bastante largo para poder determinar con solvencia la tasa de disminución a partir de los registros de oxígeno sobre la base del rendimiento del sensor. La captación difusiva de oxígeno debe calcularse a partir del perfil batimétrico de oxígeno haciendo coincidir las mediciones con un modelo unidimensional de transporte difusivo y respiración. Dado que los perfiles *in situ* no suelen alcanzar la profundidad de penetración del oxígeno en entornos de aguas profundas con bajas tasas de respiración, las mediciones deben abarcar la capa de sedimentos en la que se produce una importante captación de oxígeno (véase el párrafo siguiente).

143. En el caso de los perfiles verticales, tanto si se trata de mediciones *in situ* centradas en los flujos como si son mediciones en testigos centradas en la profundidad de penetración del oxígeno, el diámetro de la punta del sensor y los intervalos verticales entre mediciones consecutivas deben ajustarse de forma inversa a la pendiente del gradiente de oxígeno y, por tanto, deben ser menores en los decímetros superiores que en los inferiores. En general, los diámetros de las puntas deben ser inferiores a 100  $\mu\text{m}$  en los 0,5 m superiores e inferiores a 1 mm en las capas más profundas. Los intervalos verticales pueden comenzar con 250  $\mu\text{m}$ , mientras que pueden aumentar hasta el pequeño rango de centímetros a decímetros por debajo de 0,5 m. Los cambios de concentración en intervalos de profundidad consecutivos deben ser muy inferiores al 2 % de la concentración del agua del fondo. Los perfiles *in situ* utilizados para los cálculos de la captación difusiva de oxígeno deben abarcar la capa que contribuye considerablemente a la captación total de oxígeno. Deben abarcar al menos los 20 cm superiores o alcanzar la profundidad en la que las tasas de respiración volumétrica (determinadas mediante modelización unidimensional del transporte-reacción) caen por debajo del 10 % de la tasa máxima observada en la parte superior del perfil. En el caso de las mediciones de la captación total de oxígeno con cámaras, la frecuencia de las observaciones no es crítica, ya que la disminución del oxígeno es lenta y basta con una lectura cada dos minutos. Se pueden utilizar frecuencias más altas en caso de que las lecturas del sensor muestren una gran dispersión.

144. Para abordar la profundidad de penetración del oxígeno y la zonación de oxidación-reducción a lo largo de la capa de sedimentos óxicos, deben obtenerse mediciones de oxígeno de las aguas del fondo suprayacentes a los sedimentos y también del agua intersticial en testigos largos hasta la profundidad en la que el oxígeno desciende a cero o alcanza un mínimo.

145. El parámetro que debe medirse es el oxígeno disuelto ( $\text{O}_2$ ); los datos brutos deben proporcionarse como concentraciones (mol/l).

146. A partir de las observaciones de oxígeno en la columna de agua, deben determinarse: la utilización aparente de oxígeno, la producción neta de la comunidad, el flujo neto de exportación de carbono, las reservas de oxígeno oceánico y el consumo de desoxigenación y oxidación debido a la oxidación de metales reducidos. En el caso de los sedimentos, deben determinarse: la profundidad de penetración del oxígeno, la respiración volumétrica de las diferentes capas de sedimentos, las tasas

de consumo de oxígeno o la absorción de oxígeno de la comunidad sedimentaria, las tasas de remineralización del carbono y las tasas netas de flujo de materia orgánica hacia el fondo marino. Además, se debe caracterizar la zonación de oxidación-reducción en los sedimentos.

## F. Variable medida: sistema de carbonatos

147. En lugar de la alcalinidad de los carbonatos (como se describe en [ISBA/25/LTC/6/Rev.1](#) junto con [ISBA/25/LTC/6/Rev.1/Corr.1](#)), debe utilizarse la alcalinidad total para caracterizar el sistema de carbonatos, ya que hay moléculas distintas de los compuestos de carbonatos y bicarbonatos, como el borato, el sulfuro de hidrógeno y el carbono orgánico disuelto, que suelen contribuir a esta variable.

148. La información detallada sobre la obtención de datos relativos a las variables del sistema de carbonatos, incluida la calidad de los datos, debe consultarse en la literatura sobre oceanografía química y biogeoquímica, como Dickson *et al.* (2007) y la Comisión Europea (2011).

149. Para limitar el conjunto completo del sistema de ácido carbónico del agua de mar (es decir,  $[\text{CO}_2]$ ,  $[\text{H}_2\text{CO}_3]$ ,  $[\text{HCO}_3^-]$ ,  $[\text{CO}_3^{2-}]$  y  $[\text{H}^+]$ ), se deben utilizar la presión, la temperatura y la salinidad junto con dos de los siguientes elementos: carbono inorgánico disuelto, alcalinidad de carbonatos,  $\text{pCO}_2$  y pH (Millero, 2013). Si bien la alcalinidad total es una variable sólida del sistema de carbonatos que puede medirse *ex situ* sin crear artefactos, el carbono inorgánico disuelto, el pH y la  $\text{pCO}_2$  son sensibles a los cambios de presión y temperatura, así como a la desgasificación inducida al trasladar las muestras del fondo marino a la superficie del mar. Por tanto, el pH y la  $\text{pCO}_2$  deben medirse *in situ* para evitar artefactos de muestreo *ex situ* que no puedan corregirse durante el procesamiento de los datos.

150. Para tener en cuenta las contribuciones a la alcalinidad total de otras sustancias químicas, como el borato y el sulfuro de hidrógeno, deben realizarse mediciones adicionales en el agua intersticial de los sedimentos. Como es difícil medir las especies individuales, estas variables adicionales suelen ser la concentración total de boro (es decir, la suma de borato y ácido bórico) y la concentración total de sulfuro (es decir, la suma de  $[\text{S}_2^-]$ ,  $[\text{HS}^-]$  y  $[\text{H}_2\text{S}]$ ). Son variables sólidas que pueden medirse *ex situ*.

151. Debe consultarse la ficha de especificaciones de las variables oceánicas esenciales del GOOS para obtener más información sobre las actuales redes mundiales de observación, incluidas las técnicas de sensores disponibles (principalmente para el contenido de  $\text{CO}_2$  y el pH, por ejemplo, en el caso de los datos biogeoquímicos de Argo) y la futura capacidad de observación.

152. El sistema de carbonatos debe determinarse utilizando la alcalinidad total y al menos uno de los siguientes elementos: carbono inorgánico disuelto, pH y  $\text{pCO}_2$  (Dickson *et al.*, 2007; Comisión Europea, 2011). Otras variables, como la concentración total de boro, la concentración total de sulfuro y el carbono orgánico disuelto, deben considerarse también, si contribuyen a la alcalinidad total (Luff *et al.*, 2001; Zeebe y Wolf-Gladrow, 2001).

153. Las metodologías para cada una de ellas son las siguientes:

a) En las muestras de agua intersticial, la alcalinidad total debe determinarse en alícuotas de agua intersticial extraída mediante la valoración con una solución diluida de HCl, observando el cambio de pH de forma espectroscópica, potenciométrica u óptica (por ejemplo, utilizando un indicador de pH adecuado) y haciendo que la solución burbujee en el recipiente de valoración con nitrógeno o gas

argón para eliminar de la solución el CO<sub>2</sub> y el H<sub>2</sub>S producidos (por ejemplo, Wallmann *et al.*, 2006); Haffert *et al.*, 2013).

b) En las muestras de la columna de agua, debe seguirse la metodología indicada en las directrices relativas a la comunidad de acidificación del océano, es decir, Dickson *et al.* (2007) y la Comisión Europea (2011).

c) El contenido total de carbono inorgánico disuelto debe determinarse de forma coulométrica en alícuotas de agua intersticial extraída. Las muestras deben protegerse de la degradación microbiana añadiendo una solución de HgCl<sub>2</sub> y deben almacenarse en viales bien cerrados que hayan sido enjuagados con gas nitrógeno para evitar un intercambio de gas con la atmósfera. El carbono inorgánico disuelto debe convertirse en CO<sub>2</sub> tratando la muestra con ácido fosfórico. Para la medición, el gas debe transferirse al coulómetro con un gas portador de helio purificado. Los sulfuros disueltos en la muestra deben precipitarse como monosulfuro de cobre (CuS) añadiendo sulfato de cobre (CuSO<sub>4</sub>) a la muestra. En un procedimiento equivalente, la signatura isotópica  $\delta^{13}\text{C}$  del carbono inorgánico disuelto debe determinarse mediante espectrometría de masas de proporciones isotópicas. La signatura isotópica estable del carbono inorgánico disuelto proporciona información adicional que ayuda a discriminar la producción de carbono inorgánico disuelto organoclastico de las rutas de oxidación del metano.

d) Los perfiles de pH deben determinarse *in situ* utilizando microelectrodos de vidrio (por ejemplo, Wenzhöfer *et al.*, 2001; Revsbech y Jorgensen, 1986).

e) La concentración de pCO<sub>2</sub> o de CO<sub>2</sub> disuelto debe determinarse *in situ* utilizando microoptodos (por ejemplo, Wenzhöfer *et al.*, 2001).

f) La concentración total de boro debe determinarse mediante espectrometría de emisión óptica con plasma acoplado o espectrometría de masas con plasma acoplado inductivamente.

g) La concentración total de sulfuro debe determinarse espectrofotométricamente como azul de metileno (Grasshoff *et al.*, 1999; Haffert *et al.*, 2013).

h) El carbono total disuelto debe determinarse en la misma muestra que el carbono inorgánico disuelto, como se describe en la sección H.

154. Como el sistema de carbonatos marinos está limitado por la medición de algunas de sus variables para calcular las otras especies (por ejemplo, Luff *et al.*, 2001; Zeebe y Wolf-Gladrow, 2001), se debe informar de las incertidumbres propagadas de las variables calculadas. El factor más importante para la propagación de la incertidumbre del sistema de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) marino es la elección de las propias incertidumbres de entrada (Orr *et al.*, 2018). Dado que las muestras pueden conservarse fácilmente y las mediciones se realizan con una baja incertidumbre, debe utilizarse la medición de las variables sumatorias: alcalinidad total, carbono inorgánico disuelto, concentración total de boro y concentración total de sulfuro; no obstante, pueden utilizarse otras combinaciones, como el pH y el carbono inorgánico disuelto, para calcular la alcalinidad de los carbonatos y las especies de carbonatos, si pueden despreciarse las contribuciones del borato y el sulfuro de hidrógeno a la alcalinidad total.

155. El uso de muestras de material de referencia certificado tanto para el análisis del carbono inorgánico disuelto como de la alcalinidad total es un planteamiento de importancia crítica para evaluar la química del agua de mar a lo largo del tiempo, a fin de calcular con precisión la pCO<sub>2</sub> y el pH de las muestras de agua de mar. A este respecto, el material de referencia del agua de mar debe obtenerse en la AICFO o el Instituto Scripps de Oceanografía. Dickson *et al.* (2007) debe utilizarse como guía

para calcular la desviación típica de las mediciones. Para la incertidumbre y su propagación, debe consultarse la documentación de Orr *et al.* (2018). Las mismas referencias deben utilizarse para ver los enlaces y la documentación sobre las rutinas complementarias de los paquetes informáticos con los que se pueden calcular las variables de la química de los carbonatos (seacarb, CO2SYS para Excel, CO2SYS para MATLAB, mocsy). Además, existen paquetes informáticos de libre acceso para otros sistemas ácido-base, como el borato y el sulfuro, que contribuyen al pH y a la alcalinidad total (AquaENV; Hofmann *et al.* 2010), y para los efectos de la presión (SUGAR Toolbox; Kossel *et al.*, 2013).

156. A partir de esas mediciones, hay que calcular: los estados de saturación de los minerales carbonatados, como el aragonito y la calcita, y de los minerales de silicato; la profundidad de compensación de los carbonatos; la lisoclina; las tasas de reacción para la disolución de minerales de carbonato/silicato; la remineralización de la materia orgánica; y la oxidación de los metales reducidos. Se debe determinar la zonificación de oxidación-reducción.

## G. Variable medida: metales traza

157. La publicación *Sampling and Sample-handling Protocols for Geotraces Cruises*, también conocida como el “libro de recetas de Geotraces”, debe consultarse para obtener recomendaciones específicas sobre los procedimientos adecuados de muestreo, limpieza y manipulación de muestras de elementos traza (partículas y total disuelto) y sus isótopos en el agua de mar, así como sobre los procedimientos para obtener medidas de exactitud y precisión.

158. Para evaluar el ciclo de los elementos traza y la toxicidad, debe determinarse la especiación física y química de los metales traza disueltos en lugar de las concentraciones totales disueltas. Los métodos para la especiación del tamaño físico de los metales traza en el conjunto total disuelto (que incluye los coloides y las nanopartículas, así como las especies verdaderamente disueltas) no están contemplados en el libro de recetas de Geotraces. Todavía no se ha publicado ninguna guía de buenas prácticas sobre este tema, por lo que debe consultarse la bibliografía más actualizada en el momento del muestreo.

159. Para el fraccionamiento por tamaño del agua de mar y el agua intersticial, se pueden emplear estos métodos, entre otros:

a) Filtración secuencial que da lugar a diferentes fracciones de tamaño:  $> 0,2 \mu\text{m}$  (partículas),  $< 0,2 \mu\text{m}$  (total disuelto),  $0,02\text{-}0,2 \mu\text{m}$  (coloides inorgánicos como oxihidróxidos de Fe, arcillas, óxidos de Mn),  $< 0,02 \mu\text{m}$  (soluble: pequeños coloides orgánicos, realmente disueltos), acidificación a bordo de las muestras no filtradas (para las concentraciones totales solubles);

b) Ultrafiltración con un corte de peso molecular de 1 kDa (donde un conjunto de tamaños entre 1 kDa y  $0,2 \mu\text{m}$  contiene toda la materia coloidal y las nanopartículas, y un conjunto de tamaños inferior a 1 kDa se define como un conjunto verdaderamente disuelto), realizada a bordo si la disponibilidad de volumen de la muestra lo permite, que es el principal factor limitante cuando el objetivo es llevar a cabo una ultrafiltración del agua intersticial.

160. Existen otros métodos para evaluar la especiación química, entre ellos:

a) Métodos voltamperométricos, análisis de laboratorio casero;

b) Gradientes difusivos en muestreadores pasivos de película fina para concentraciones de metales lábiles, muestreo a bordo, análisis de laboratorio casero.

161. Las muestras deben conservarse adecuadamente (por ejemplo, mediante la acidificación con HCl ultrapuro hasta un pH  $\sim 1,8$  para analizar la concentración de metales traza; además, véase el libro de recetas de Geotracas para más detalles) o congelarse (por ejemplo, para el análisis de especiación química y el análisis de ligandos).

162. Debe consultarse Planquette y Sherrell (2012) para obtener detalles sobre el muestreo y el tratamiento de las muestras para detectar metales traza en partículas en la columna de agua mediante filtración *in situ*, filtración con botella y trampas de sedimentos.

163. La cuestión de qué métodos analíticos son los mejores para los metales traza en el agua de mar y en el agua intersticial está sujeta a cambios debido a los avances tecnológicos y a la disponibilidad de instrumentos, por lo que son posibles varios métodos analíticos. El uso de los análisis y el procesamiento de datos adecuados debe demostrarse con los metadatos solicitados. En general, los datos de la concentración de metales deben obtenerse mediante espectrometría de emisión óptica con plasma acoplado inductivamente y espectrometría de masas con plasma acoplado inductivamente. Antes del análisis de plasma acoplado inductivamente, las muestras de sedimentos deben ser tratadas mediante presión ácida o digestión por microondas con combinaciones de ácidos adecuadas, por ejemplo HF + HClO<sub>4</sub> o HF + HCl + HNO<sub>3</sub> (Paul *et al.*, 2018, Nöthen y Kasten, 2011). Para los metales traza en el agua de mar y en el agua intersticial, se recomienda encarecidamente el uso de un dispositivo SeaFAST de preconcentración y separación de la matriz. Los materiales de referencia certificados para metales traza y contaminantes inorgánicos en la fase sólida (MESS-4, NIST-2702) y el agua de mar (por ejemplo, las normas de intercalibración NASS-7, CASS-6, SLEW-3 o Geotracas) o, si no existen, las normas propias (por ejemplo, para el agua intersticial) deben procesarse y medirse junto con las muestras para documentar la exactitud y la precisión analíticas.

164. Los parámetros que deben medirse son las concentraciones de hierro, manganeso, cobalto, cobre, níquel, zinc, cadmio, arsénico, plomo y vanadio. Los resultados deben presentarse en fracciones de un mol por unidad de masa o volumen (por ejemplo, nmol kg<sup>-1</sup> o nmol l<sup>-1</sup>). Deben determinarse en cada una de las fracciones de tamaño definidas operacionalmente (partículas, total disuelto < 0,2  $\mu\text{m}$ , y nanopartículas/coloides 0,02-0,2  $\mu\text{m}$ ) observando la especiación química (concentraciones totales y lábiles, especiación de oxidación-reducción, formación de complejos con ligandos orgánicos).

165. A partir de estas mediciones, deben determinarse: los flujos de metales traza, la distribución entre diversas especies físicas y químicas, las concentraciones lábiles, los tipos y concentraciones de nanopartículas y coloides y la zonación de oxidación-reducción en los sedimentos (incluida la variabilidad espacial y temporal).

## H. Variable medida: materia orgánica e inorgánica

166. Las observaciones de referencia deben abordar la cantidad, calidad y labilidad de la materia orgánica disuelta y particulada, así como del carbono inorgánico en partículas en la columna de agua y en el fondo marino, incluida su variabilidad temporal y espacial, utilizando mediciones de indicadores apropiados. Las observaciones de materia particulada en la columna de agua deben incluir partículas orgánicas e inorgánicas.

167. El énfasis principal de las observaciones de referencia debe ser una caracterización bien reproducida del carbono inorgánico particulado, la materia orgánica particulada y el nitrógeno orgánico disuelto en la columna de agua y en los

decímetros superiores de los sedimentos, donde las tasas de conversión biogeoquímica son más altas y donde los conocimientos actuales indican que el impacto es probablemente más acusado. Para el análisis de los sedimentos, además de la resolución señalada en la sección III.A, debe medirse el carbono inorgánico particulado y la materia orgánica particulada en los sedimentos más profundos y antiguos en algunos lugares para ayudar a caracterizar los distintos entornos encontrados en la zona, lo cual incluye la productividad y los regímenes de deposición del pasado.

168. Para el análisis del fondo marino, la distribución de la cantidad y las características del carbono inorgánico particulado y la materia orgánica particulada debe determinarse en submuestras tomadas de distintas capas de profundidad de los testigos recuperados, mientras que el nitrógeno orgánico disuelto debe analizarse en el agua intersticial extraída de distintas capas de profundidad. En los decímetros superiores de los sedimentos, las muestras necesarias para el análisis deben tomarse con muestreadores de última generación que sean capaces de recuperar la capa superficial semilíquida y esponjosa (por ejemplo, sacatestigos múltiples, sacatestigos de empuje manipulados mediante un ROV). Los estratos más profundos deben ser extraídos con un sacatestigo de gravedad o un sacatestigo de pistón.

#### 1. Materia orgánica disuelta

169. La cantidad de nitrógeno orgánico disuelto debe cuantificarse en términos de carbono orgánico disuelto junto con las mediciones de nitrógeno total disuelto, normalmente mediante oxidación catalítica a alta temperatura y después de eliminar el carbono inorgánico y la materia orgánica volátil mediante acidificación y purga con gas inerte. La relación entre el carbono orgánico disuelto y el nitrógeno orgánico disuelto (calculada restando la suma de  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{NO}_3^-$  y  $\text{NO}_2^-$  del nitrógeno total disuelto) proporciona una primera indicación de la composición química del nitrógeno orgánico disuelto; debe utilizarse para una caracterización general de la calidad del nitrógeno orgánico disuelto (es decir, la disponibilidad potencial para los organismos como fuente de alimento). Una caracterización molecular general del nitrógeno orgánico disuelto debe determinarse a partir del análisis óptico del conjunto coloreado y fluorescente. Se pueden utilizar para ello instrumentos disponibles en el mercado que recogen fácilmente los espectros de emisión de excitación mediante espectroscopía de fluorescencia y los combinan con mediciones basadas en la espectroscopía de absorción.

170. Debe consultarse Dickson *et al.* (2007) para conocer las mejores prácticas de medición del carbono orgánico disuelto en la columna de agua.

171. Los parámetros que deben medirse en la columna de agua son el carbono orgánico disuelto y el nitrógeno disuelto.

172. Los parámetros que deben medirse para el agua intersticial son el carbono orgánico disuelto, el nitrógeno total disuelto, los aminoácidos y los hidratos de carbono disueltos y las características ópticas del nitrógeno orgánico disuelto (materia orgánica disuelta coloreada, materia orgánica disuelta fluorescente).

173. En el caso de la columna de agua, las observaciones deben utilizarse para determinar la contribución del carbono orgánico disuelto a la producción neta de la comunidad y a los flujos de exportación de carbono.

174. En el caso de los sedimentos, las observaciones deben servir para determinar la cantidad y la calidad de la materia orgánica y su variabilidad espacio-temporal para cuantificar y explicar las tasas de remineralización de la materia orgánica. Deben utilizarse en combinación con la formación de complejos de metales traza y la biodisponibilidad.

## 2. Materia particulada

175. Por lo que respecta a la materia particulada, se utilizan diversas variables para describir las partículas en suspensión (materia total en suspensión) y el transporte de partículas en el océano, tanto de la fracción orgánica como de la inorgánica. Las partículas pueden recogerse en la columna de agua mediante varias técnicas de muestreo:

- a) Por filtración del agua de las botellas Niskin o Go-Flo;
- b) Con bombas *in situ*;
- c) Con trampas de sedimentos.

176. Cada una de estas técnicas de muestreo tiene sus ventajas e inconvenientes. Por lo tanto, debe utilizarse una combinación de todas ellas. Si bien las técnicas de muestreo basadas en la filtración de muestras de agua recogidas con dispositivos de muestreo de agua, como las botellas Niskin o Go-Flo, están limitadas a volúmenes relativamente pequeños ( $< 12$  l), las bombas *in situ*, capaces de filtrar grandes volúmenes (cientos de litros por hora) deben utilizarse para recoger masas mayores de partículas, ya que son necesarias para ciertas investigaciones (como la de la actividad de radioisótopos específicos). Debe obtenerse un perfil batimétrico conectando bombas individuales *in situ* en secuencia a un cable (por ejemplo, un cable CTD) y programándolas para que bombeen a la profundidad deseada durante dos o cuatro horas. Las partículas obtenidas al filtrar el agua de mar de las botellas y con bombas *in situ* deben utilizarse para determinar la concentración, el tipo y la cantidad de partículas; son adecuadas para las investigaciones de metales traza. El hecho de que las partículas se hundan y, si lo hacen, con qué rapidez (es decir, su contribución a los flujos de exportación) depende de su tamaño, forma y densidad. Los flujos de exportación deben deducirse indirectamente midiendo la actividad de los radiotrazadores (véase la sección I). Además, las mediciones directas de los flujos de partículas deben obtenerse con trampas de sedimentos, que recogen las partículas que se hunden a cierta profundidad durante un período de varios días a varios meses. La cantidad, el tipo y la calidad de las partículas que se hunden deben evaluarse directamente.

177. Se deben consultar el libro de recetas de Geotraces, Bishop *et al.* (2012) y Planquette y Sherrell (2012) para obtener orientación sobre las mejores prácticas en los métodos de muestreo y procesamiento de muestras para las investigaciones sobre partículas con el uso de la filtración *in situ* y la filtración a bordo a partir de botellas Go-Flo, con especial hincapié en los metales traza. También debe consultarse el libro de recetas de Geotraces para conocer las modificaciones recomendadas del método de determinación del carbono orgánico particulado y el nitrógeno particulado publicado originalmente en el informe 19 del JGOFS (Knap *et al.*, 1996), que contiene las recomendaciones para el JGOFS y es un método ampliamente empleado y citado para muestras de pequeño volumen de carbono orgánico particulado y nitrógeno particulado (es decir,  $< 10$  l).

178. McDonnell *et al.*, (2015) debe utilizarse para una revisión de los métodos de recogida de materia particulada ( $> 0,2 \mu\text{m}$ ) y su aplicación en estudios del ciclo biogeoquímico a partir de botellas, bombas *in situ* y trampas de sedimentos, con detalles sobre los tipos de filtros recomendados, los protocolos de muestreo de las trampas de sedimentos (incluidos la limpieza, la conservación y el procesamiento de las muestras) y los sesgos de recogida de las trampas de sedimentos. Los detalles sobre el muestreo de partículas, el tratamiento o procesamiento de las muestras y la determinación de los tipos, la composición y la concentración de las partículas, la masa de las partículas en suspensión y los flujos de partículas deben obtenerse de Lam *et al.* (2018), Boxhammer *et al.* (2018) y Huffard *et al.* (2020), y además pueden

deducirse de las directrices sobre la observación de los océanos publicadas por la Sociedad Oceanográfica del Japón y el protocolo sobre el muestreo y las mediciones del carbono orgánico particulado del Grupo internacional de coordinación en relación con el color de los océanos.

179. Una revisión de las técnicas ópticas para la caracterización remota e *in situ* de las partículas marinas sin recolección y recuperación se puede encontrar en Boss *et al.* (2015), donde se tratan las técnicas para evaluar las propiedades generales, incluidas la masa de las partículas, la distribución del tamaño de las partículas y la información de la forma de las partículas, junto con las propiedades ópticas de las partículas individuales, como el tipo y el tamaño de las partículas individuales. Además, los autores repasan los avances en las tecnologías de la imagen y su uso en el estudio de las partículas marinas *in situ*. Se pueden encontrar más detalles en Giering *et al.* (2020) y Huffard *et al.* (2020).

180. La ficha de especificaciones de las variables oceánicas esenciales del GOOS puede consultarse para obtener más información sobre las actuales redes mundiales de observación y los enlaces a la bibliografía sobre las innovaciones en materia de observación de datos autónomos.

181. Los parámetros que deben medirse en el caso de la columna de agua son la materia orgánica particulada (carbono orgánico particulado, nitrógeno orgánico particulado, fósforo orgánico particulado), la sílice biogénica, el carbono inorgánico particulado, el carbono orgánico total, el nitrógeno total, la materia suspendida total, el flujo de carbono orgánico particulado, el flujo de carbonato de calcio ( $\text{CaCO}_3$ ), el flujo de sílice biogénica, las partículas litogénicas, los óxidos y oxihidróxidos de hierro y manganeso, la concentración de materia particulada, el suministro de carbono o la demanda de carbono y la estequiometría Redfield (C:N:P) de la materia orgánica particulada.

182. La cantidad y calidad del material que se hunde varía estacional e interanualmente, por lo que se debe hacer especial hincapié en el muestreo semanal o mensual de la producción primaria y en la resolución mensual o anual de los flujos de exportación.

183. Las observaciones de la materia orgánica en los sedimentos deben referirse a la cantidad de materia particulada junto con la cantidad de materia orgánica biodisponible y su calidad (es decir, frescura o labilidad). Se pueden adoptar varios planteamientos (por ejemplo, Pusceddu *et al.*, 2009; Meckler *et al.*, 2004, y sus referencias), pero debe existir un conjunto básico de estimaciones coherentes en todos los estudios de referencia. La información sobre la cantidad de materia orgánica biodisponible debe obtenerse midiendo el carbono orgánico total y el nitrógeno total, normalmente mediante un analizador elemental tras la eliminación del carbono inorgánico por acidificación. La relación entre el carbono orgánico total y el nitrógeno total (la relación C:N) proporciona una primera indicación de la calidad de la materia orgánica particulada. Se debe obtener información más específica sobre la calidad de la materia orgánica midiendo los equivalentes de los pigmentos cloroplásticos, incluidos la clorofila a y sus productos de degradación; mediante un análisis fluorométrico simple; mediante cromatografía en fase líquida de alta resolución; o midiendo el carbono biopolimérico, incluidos los lípidos, las proteínas y los carbohidratos hidrolizables (mediante análisis químico por vía húmeda). La frescura de la materia orgánica particulada debe determinarse mediante la relación entre equivalentes de clorofila a y de pigmentos cloroplásticos (o el índice de cloro, que es similar), o sobre la base de los análisis de la composición específica de las clases de biomoléculas (por ejemplo, la relación entre las proteínas, los lípidos y los carbohidratos hidrolizables y los totales); el índice de degradación según la

composición de aminoácidos; o las tasas de ácidos grasos con diferentes niveles de saturación).

184. Junto con el carbono orgánico total y el nitrógeno total, el carbono inorgánico particulado debe medirse con un analizador de elementos CNS. El carbono inorgánico particulado se suele indicar como contenido de carbonato de calcio ( $\text{CaCO}_3$ ), en forma de porcentaje de peso de la muestra de sedimento seco.

185. Se espera que la distribución de la materia orgánica particulada sea heterogénea, especialmente cerca de la superficie de los sedimentos. Debido a su baja densidad, la deposición de partículas de materia orgánica en el fondo marino suele depender de los patrones a pequeña escala de las corrientes y de la morfología del fondo marino, lo que da lugar a distribuciones irregulares y a acumulaciones locales, como en las pequeñas depresiones. Deben utilizarse métodos estadísticos apropiados para decidir el número de réplicas necesarias y la resolución adecuada. Esa información debe ir acompañada de los datos brutos. El número de réplicas nunca debe ser inferior a tres testigos por lugar y campaña de muestreo. Siempre que sea posible, se utilizarán estudios de imágenes del fondo marino (sistemas de imágenes sobre cables, AUV) o series cronológicas (sistemas sobre plataformas, vehículos oruga submarinos bentónicos) para obtener información semicuantitativa sobre la variabilidad espacial y temporal del suministro, las reservas y el procesamiento de la materia orgánica particulada fresca en el fondo marino (observaciones semicuantitativas de la distribución del fitodetrito verdoso en imágenes en color, observaciones cuantitativas del pigmento cloroplástico con imágenes de fluorescencia o técnicas hiperespectrales).

186. A partir de las mediciones de la materia particulada en la columna de agua, deben obtenerse datos como la producción primaria, la acidificación del océano, los flujos de exportación, el suministro de carbono y la atenuación de la materia orgánica en la columna de agua. A partir de la fracción de partículas inorgánicas (carbono inorgánico particulado, sílice biogénica) se debe determinar el origen principal de la biomasa, (es decir, organismos calcificadores o silicificadores) junto con la cantidad de lastre de carbono orgánico particulado, que es un importante impulsor de la exportación de carbono orgánico particulado desde la zona eufótica (Klaas y Archer, 2002). En el caso de los sedimentos, las observaciones deben utilizarse para cuantificar las reservas y la rotación del carbono bentónico y evaluar su disponibilidad para la remineralización por parte de las comunidades bentónicas. Esta información debe combinarse con las observaciones de los flujos de exportación de materia orgánica e inorgánica particulada, la captación de oxígeno, el sistema de carbonatos, los nutrientes y los metales traza mediante modelos de transporte-reacción para evaluar cuantitativamente el ciclo biogeoquímico bentónico en cuanto a materia orgánica, nutrientes y elementos traza.

## **I. Variable medida: trazadores de isótopos radiactivos (radiotrazadores)**

187. Para el muestreo, el procesamiento de las muestras y el análisis de los radionucleidos de vida larga y los radionucleidos de vida corta en el agua de mar (por ejemplo,  $^{230}\text{Th}$  y  $^{210}\text{Pb}$ , respectivamente), las partículas del penacho de sedimentos en suspensión y los sedimentos, deben seguirse las recomendaciones detalladas en el libro de recetas de Geotracers. Los parámetros que deben medirse son  $^{230}\text{Th}$ ,  $^{234}\text{Th}$ ,  $^{210}\text{Po}$ ,  $^{210}\text{Pb}$ ,  $^{231}\text{Pa}$ ,  $^{224}\text{Ra}$ ,  $^{226}\text{Ra}$ ,  $^{228}\text{Ra}$ ,  $^{227}\text{Ac}$  disueltos, coloidales y particulados y la radiación alfa bruta.

188. Para determinar la actividad de los radionúclidos de vida corta (por ejemplo,  $^{210}\text{Pb}$ ) en los sedimentos:

a) Unos pocos gramos de muestras de sedimento secas y homogeneizadas deben sellarse herméticamente y dejarse durante al menos varias semanas para asegurarse de que los radioisótopos están en equilibrio secular (es decir, actividad radioisotópica constante porque la tasa de producción es igual a la tasa de desintegración);

b) La actividad total del  $^{210}\text{Pb}$  y el  $^{226}\text{Ra}$  debe determinarse directamente por espectrometría gamma (detector de germanio de alta pureza (germanio de amplia energía));

c) Además, el  $^{210}\text{Pb}$  total puede medirse indirectamente por espectrometría alfa (detector PIPS) a través de su isótopo nieto  $^{210}\text{Po}$ ;

d) La calibración externa debe realizarse con material de referencia certificado como el IAEA-RGU-1 (mineral de uranio).

189. La actividad de los radionucleidos de larga vida en los sedimentos ( $^{230}\text{Th}$  y  $^{231}\text{Pa}$ ) y en las partículas y la columna de agua (serie Ra) debe determinarse mediante:

a) Espectrometría gamma (Yokoyama y Nguyen, 1980);

b) Espectrometría alfa (Lao *et al.*, 1992);

c) Espectrometría de masas (Geibert *et al.*, 2019);

d) Para el análisis de sedimentos y partículas, se debe utilizar como material de referencia certificado el IAEA-385 (sedimento del mar de Irlanda) (Pham *et al.*, 2008);

e) Para los análisis de la columna de agua, se podría utilizar el IAEA-443 (agua del mar de Irlanda) (Pham *et al.* 2011) como material de referencia certificado.

190. La determinación de la radiación alfa bruta puede sustituirse por la medición de  $^{230}\text{Th}$ ,  $^{226}\text{Ra}$  y  $^{231}\text{Pa}$  individualmente, y luego calcular la radiación alfa bruta esperada sobre la base de los equilibrios con sus respectivos isótopos hijos.

191. La actividad debe presentarse como actividad total, en materia disuelta y en materia particulada, expresada en dpm/g o  $\text{Bq kg}^{-1}$ . Toda la actividad radioisotópica (excepto sus relaciones) debe corregirse para la interferencia de la sal del agua intersticial durante el análisis (Kuhn, 2013; Geibert *et al.*, 2019) y se debe registrar el procedimiento exacto y las correcciones.

192. A partir de estas mediciones, deben determinarse: las concentraciones y la actividad, el déficit de  $^{230}\text{Th}$ , los flujos de radionucleidos, los flujos elementales de hundimiento y las tasas de sedimentación. Además, hay que determinar la profundidad de la bioturbación, la actividad de bioturbación, el modo de bioturbación (es decir, mezcla difusiva o no local), el nivel de radiación y las reacciones entre el agua intersticial y los minerales (por ejemplo, disolución o precipitación de carbonatos) dentro de los sedimentos.

193. Para el análisis de los datos existen modelos numéricos de transporte-reacción o soluciones analíticas. Por ejemplo, el modelo de concentración inicial constante es un sistema sencillo que se utiliza para calcular las tasas de sedimentación de los sedimentos de aguas profundas. Utilizando la actividad media del  $^{230}\text{Th}$  o el  $^{231}\text{Pa}$  dentro de la capa bioturbada del sedimento no perturbado (en la que no se observa ninguna tendencia significativa de profundidad para el exceso de  $^{230}\text{Th}$  o de  $^{231}\text{Pa}$ ), se determina la profundidad a la que la actividad ha decaído hasta la mitad de ese nivel. La diferencia entre esta profundidad y el fondo de la capa bioturbada, dividida por el período de semidesintegración en cuestión, es una aproximación a la tasa de sedimentación en ese lugar.

## J. Calidad de los datos

### 1. Oceanografía química

194. Cinco programas que trabajan con datos oceanográficos, a saber, la Alianza para las Tecnologías Costeras, el proyecto AtlantOS, el IMOS, la Comisión Técnica Mixta sobre Oceanografía y Meteorología Marina y el Proyecto de garantía de calidad o control de calidad de los datos oceanográficos en directo del Sistema Integrado de Observación de los Océanos de los Estados Unidos, publicaron conjuntamente una revisión de las mejores prácticas existentes en materia de garantía de calidad (Bushnell *et al.*, 2019), que debe consultarse para conocer los detalles sobre el mantenimiento de registros con fines de garantía de calidad, listas de comprobación, recomendaciones de mantenimiento, formas de mejorar la incertidumbre de las mediciones y recomendaciones generales de garantía de calidad en relación con los datos oceanográficos. También en esa revisión, el recientemente creado Sistema de Mejores Prácticas Oceánicas se identifica como un medio para desarrollar, compartir, documentar y mantener procesos de garantía de calidad más específicos.

195. En oceanografía química, las incertidumbres vinculadas al proceso de muestreo, al tratamiento de las muestras y a las mediciones analíticas afectan a los valores de los datos obtenidos de las muestras de agua. Estas incertidumbres pueden reducirse aumentando el número de observaciones. Deben distinguirse de otro tipo de incertidumbre, a saber, la incertidumbre o variabilidad de un valor de datos para condiciones ambientales similares en el espacio y el tiempo que surge de la repetición del muestreo o del registro de datos (por ejemplo, un mismo lugar muestreado en tres años diferentes en la misma época, o tres muestras tomadas en lugares similares pero no idénticos en un radio de aproximadamente 10 km). Un alto rigor analítico (es decir, exactitud y precisión) ayuda a distinguir las fuentes de incertidumbre.

196. En el caso de los metales traza, Geotrace establece que deben medirse dos categorías de repeticiones: repeticiones de campo y repeticiones analíticas. La repetición analítica es el análisis repetido de una misma muestra. Es una medida de la mayor precisión posible para un análisis concreto. La repetición de campo es el análisis de dos o más muestras tomadas de una misma botella de muestreo. Tiene un componente añadido de variación debido al submuestreo, el almacenamiento y la variabilidad natural dentro de la muestra. La variación de las repeticiones de campo y analíticas debe ser igual cuando el muestreo y el almacenamiento no tienen ningún efecto sobre el análisis (suponiendo que el analito se distribuye homogéneamente dentro de la botella de muestreo).

### 2. Biogeoquímica

197. El número de muestras u observaciones repetidas necesarias para describir adecuadamente las condiciones biogeoquímicas de referencia en las distintas unidades fisiográficas (véase la sección III.A) depende no solo de la variabilidad natural existente, sino también de cambios relativos que se produzcan en respuesta a actividades mineras que deben identificarse. Deben utilizarse herramientas estadísticas adecuadas, como el análisis de la potencia (Sweetman *et al.*, 2019), para evaluar la cantidad de muestreo que se requiere para detectar un cambio a un nivel específico y con una potencia estadística concreta. El nivel meta de cambio que debe resolverse para variables específicas depende principalmente de la magnitud del cambio habitualmente vinculado a impactos relacionados con la minería, junto con la importancia de la variable para servir como indicadora del estado, el deterioro y la recuperación del ecosistema. Como orientación, la repetición elegida debe permitir la detección de desviaciones inferiores al 30 % en comparación con las condiciones de referencia, con una potencia estadística de al menos 0,95 (Ardrón *et al.*, 2019). Las

estadísticas sobre el nivel de cambio que puede detectarse para las distintas variables deben notificarse junto con los datos de referencia.

198. Para decidir la magnitud del muestreo inicial, se debe recoger la información disponible sobre la variabilidad natural, teniendo en cuenta que tres repeticiones deben considerarse siempre un mínimo. La repetición requerida para las variables debe revisarse periódicamente a medida que se disponga de más información sobre la variabilidad natural y la importancia de las respectivas variables a partir de las observaciones de referencia, los estudios de impacto y la modelización integrada de las condiciones de partida y los cambios.

## **K. Gestión de los datos**

199. Las notas técnicas del Programa de Descubrimiento Oceánico Internacional y de su predecesor, el Programa Integrado de Perforaciones Oceánicas, contienen detalles sobre los datos y sobre la gestión y la conservación de las muestras (así como sobre el muestreo y el análisis biogeoquímico y geológico) que deben tenerse en cuenta.

200. Los metadatos son necesarios para documentar si el muestreo y los análisis se han llevado a cabo adecuadamente y para rastrear los datos proporcionados hasta su origen. Deben facilitarse para todas las variables químicas. Los metadatos relacionados con el muestreo y el registro de las muestras, así como los datos resultantes, deben ajustarse a las directrices definidas por el International Data Assembly Centre de Geotraces ([www.bodc.ac.uk/geotraces/](http://www.bodc.ac.uk/geotraces/)), el CIEM y el Grupo de Trabajo sobre Gestión de Datos Marinos. Se puede encontrar más información y protocolos sobre los metadatos en la guía de mejores prácticas de gestión de datos recopilada por la Biological and Chemical Oceanography Data Management Office, sobre la base de la experiencia adquirida por los programas de investigación oceánica Globec y JGOFS. Comprende un conjunto de recomendaciones de buenas prácticas para la gestión de los datos obtenidos en los cruceros de investigación. La guía puede descargarse de <http://bco-dmo.org/resources>. Se pueden encontrar más directrices para la gestión de datos y metadatos en el repositorio del Sistema de Mejores Prácticas Oceánicas y en la comunidad del programa Argo.

## **VI. Propiedades geológicas**

### **A. Introducción**

201. En combinación con los parámetros biogeoquímicos (véase la sección V), las propiedades geológicas tienen como objetivo caracterizar el hábitat y determinar la heterogeneidad del entorno del fondo y el subfondo marino (batimetría y geomorfología, entorno geológico, sedimentos y estratigrafía, diagénesis, meteorización y removilización, geoquímica y mineralogía del sustrato rocoso, geoquímica y mineralogía de los recursos minerales) y ayudar a ubicar los lugares de muestreo adecuados para caracterizar la distribución y la composición de las comunidades de fauna.

202. Las siguientes variables constituyen el fundamento de una base de referencia geológica:

a) Batimetría: se utiliza para cartografiar las características morfológicas del fondo marino a gran y pequeña escala; puede utilizarse para planificar otros tipos de muestreo.

b) Propiedades de los sedimentos y clasificación del hábitat: importante para caracterizar el hábitat bentónico; además, las propiedades deben utilizarse para cuantificar la deformación y los cambios de las propiedades físicas de los sedimentos del fondo marino durante las operaciones de los equipos de extracción, y para diseñar el sistema de extracción.

203. Las propiedades de los recursos son importantes para la caracterización del hábitat. Constituyen el principal objetivo de cualquier actividad de exploración en la Zona. Algunas características de los recursos pueden constituir información de interés comercial y pueden ser confidenciales en virtud de los contratos con la Autoridad. No obstante, debe presentarse una evaluación de la información necesaria para establecer la base de referencia medioambiental.

## B. Metodología general

204. Los datos y la información sobre la geología y la morfología de los fondos marinos pueden recogerse mediante:

- a) Sondeo con ecosonda multihaz (con dispositivos a bordo o sistemas remolcados por ROV o AUV);
- b) Sonar de barrido lateral (con dispositivos remolcados por el buque, ROV, AUV o por otros medios);
- c) Elaboración del perfil del subfondo (por ejemplo, con un sistema Chirp);
- d) Fotografías y grabaciones de video obtenidas mediante pinzas con cámara, trineo, ROV, AUV o sumergibles.

205. Existen diversos planteamientos metodológicos para realizar estudios geológicos y adquirir datos precisos y de alta calidad sobre las variables geológicas; se debe utilizar cualquiera de las prácticas comúnmente aceptadas.

206. Las muestras de sedimento necesarias para el análisis deben obtenerse utilizando, para los decímetros superiores del sedimento, un sacatestigos múltiple, un sacatestigos de empuje manipulado mediante un ROV o un equipo fiable similar y, para las muestras más profundas, un sacatestigos de gravedad.

207. Las metodologías específicas para el muestreo de sedimentos y la batimetría pueden encontrarse en las publicaciones del Programa de Descubrimiento Oceánico Internacional (antes llamado Programa Integrado de Perforaciones Oceánicas 2003-2013) y en el repositorio de Mejores Prácticas Oceánicas (<https://repository.oceanbestpractices.org>).

208. Las normas para los levantamientos hidrográficos son publicadas por la Organización Hidrográfica Internacional (Organización Hidrográfica Internacional, 2020) y deben consultarse.

## C. Resolución del muestreo

209. La resolución del muestreo adecuada depende de si la información se va a utilizar para la evaluación de los recursos a gran escala o para la cartografía local de los hábitats; la resolución debe ajustarse al uso previsto. Para los estudios a gran escala de toda la zona de exploración, deben elaborarse mapas batimétricos y de retrodispersión con resoluciones superiores a 80-100 m. En las zonas en las que se realicen otros muestreos discretos o en las que las condiciones indiquen una mayor variabilidad, o en las zonas en las que se prevea un impacto indirecto de la minería

(penachos de sedimentos y de descarga), deberá realizarse un muestreo de mayor resolución.

#### **D. Variable medida: batimetría**

210. En el caso de la cartografía del fondo marino, para obtener datos de alta resolución espacial sobre el estado físico de los hábitats del fondo marino, se debe utilizar la batimetría multihaz, la cartografía de retrodispersión, el sonar de barrido lateral o los métodos de sonar de apertura sintética, usando dispositivos a bordo o dispositivos arrastrados por ROV o AUV.

211. Se requiere una calibración adecuada para obtener datos batimétricos y de retrodispersión del fondo marino fiables y coherentes (Lamarche y Lurton, 2018). Se recomienda que los parámetros de obtención sean constantes y que los estudios de retrodispersión tengan un diseño específico; deben ser comparables entre distintas zonas de licencia y distintos contratistas. Las normas para los levantamientos hidrográficos se encuentran en las publicaciones de la Organización Hidrográfica Internacional (por ejemplo, Organización Hidrográfica Internacional, 2020). Además, las referencias a las publicaciones sobre la normalización de los nombres de los accidentes geográficos submarinos se encuentran en <https://iho.int/en/bathymetric-publications> y [www.gebco.net](http://www.gebco.net).

#### **E. Variable medida: propiedades de los sedimentos**

212. Para describir las propiedades de los sedimentos, hay que estudiar la mineralogía y los litoclastos de los sedimentos, la distribución del tamaño de las partículas, la porosidad y la estratigrafía general. La litología se refiere a las características físicas de una roca. La sedimentología se ocupa del origen, el transporte, la deposición y las alteraciones diagenéticas de los materiales que componen los sedimentos y las rocas sedimentarias. La estratigrafía se refiere a la investigación del modo en que las rocas sedimentarias se acumulan y distribuyen a lo largo del tiempo. Los testigos deben tomarse utilizando distintas herramientas para muestrear los 30 cm superiores de los sedimentos (sacatestigos de empuje y sacatestigos múltiple), los 50 cm superiores (sacatestigos de caja) y varios metros de profundidad (sacatestigos de gravedad).

213. Los fenómenos físicos oceanográficos, así como la minería, pueden generar estructuras sedimentarias en el fondo marino. Por lo tanto, las estructuras sedimentarias del fondo marino deben ser identificadas y cartografiadas, utilizando imágenes ópticas. Las imágenes ópticas obtenidas mediante el despliegue de diversas plataformas, incluidos los ROV, los AUV y las cámaras remolcadas o desplegadas, permiten una caracterización cuantitativa o cualitativa de los elementos o patrones geológicos, sedimentológicos (ondulaciones, marcas y coladas relacionadas con las corrientes del fondo marino) y biológicos, y de sus interrelaciones. Deben describirse las tasas y las profundidades de la bioturbación y los tipos de estructuras. Se deben utilizar sistemas de mosaico basados en Sistemas de Información Geográfica para obtener imágenes de zonas complejas o más grandes del fondo marino (García *et al.*, 2015), indicando el porcentaje de solapamiento utilizado.

214. Los testigos deben manipularse y almacenarse de forma que se maximice su utilización para estudios científicos, siguiendo las mejores prácticas de transporte, muestreo y almacenamiento (Basu *et al.*, 2020).

215. El tamaño del grano es una propiedad física fundamental de los sedimentos. Se correlaciona con las condiciones dinámicas del medio marino y es importante para

interpretar su estabilidad bajo carga. La introducción de técnicas automatizadas de medición del tamaño del grano puede añadir eficiencia y precisión a la determinación del tamaño del grano (Jaijel *et al.*, 2021). Según Jaijel *et al.*, (2021), un espectrómetro de difracción láser típico moderno tiene un rango de escala de tamaño de hasta 2.000  $\mu\text{m}$ , que abarca la gran mayoría de los sedimentos del fondo blando de los océanos del mundo. La distribución del tamaño del grano de los sedimentos debe determinarse utilizando una metodología normalizada con una manipulación adecuada (Jaijel *et al.*, 2021, y sus referencias).

216. Las caracterizaciones de los sedimentos deben llevarse a cabo examinando las muestras bajo una lupa (sedimentos no consolidados) y un microscopio petrográfico (portaobjetos, secciones delgadas) (por ejemplo, Marsaglia *et al.*, 2013, 2015a y 2015b). La composición mineralógica debe determinarse cualitativa y cuantitativamente. Existen varios métodos y combinaciones de métodos, entre ellos la mineralogía detallada, el análisis de minerales con microsonda electrónica, la difracción de rayos X y la mineralogía cuantitativa automatizada utilizando flujos de trabajo de liberación de minerales y técnicas de microscopía electrónica de barrido cuantitativa. Deben utilizarse para obtener un análisis modal cuantitativo y una petrografía virtual. Además, deben realizarse mediciones cuantitativas mediante el análisis de Rietveld, en particular para caracterizar completamente la superficie del fondo marino de las futuras zonas de extracción y para definir la fracción de arcilla (partículas de tamaño  $< 2 \mu\text{m}$ ) a fin de modelizar los posibles daños ambientales causados por los penachos.

217. La composición química de los sedimentos debe analizarse en un laboratorio equipado con sistemas de calidad de acuerdo con las normas internacionales, en particular realizando mediciones de fluorescencia de rayos X, espectrometría de masas con plasma acoplado inductivamente y espectrometría óptica con plasma acoplado inductivamente (véase la sección V).

218. Los detalles sobre los procedimientos de descripción visual de los testigos y sobre el equipo analítico, así como sobre el muestreo de sedimentos, la preparación de las muestras y los análisis y técnicas generales, pueden encontrarse en Przeslawski *et al.* (2018), Simpson y Batley (2016), Marsaglia *et al.* (2013, 2015a y 2015b), Rothwell y Rack (2006), Mazzullo *et al.* (1988) y otros recursos disponibles en <https://repository.oceanbestpractices.org/> y <http://publications.iodp.org/index.html>.

219. Deben medirse los siguientes parámetros:

a) Presencia de sedimentos: grosor y actitud de la estratificación (orientación o ángulo), contactos de la estratificación (por ejemplo, gradados, agudos y erosionados), estructuras sedimentarias (por ejemplo, estratificación laminada, estratificación gradada, estratificación cruzada, fracturas o microfallas, estructuras de escape de fluidos y bioturbación), color de los sedimentos (con la ayuda, por ejemplo, de una carta Munsell de colores de suelos para su clasificación);

b) Composición de los sedimentos: textura (arena, limo, arcilla), composición mineral, composición fósil, contenido de elementos, concreciones, material biogénico, identificación de componentes macroscópicos biogénicos y no biogénicos;

c) Diagénesis temprana: grado de diagénesis, litificación o cementación (presencia de cementos silíceos o calcáreos);

d) Propiedades físicas y mecánicas: peso específico, densidad aparente, porosidad del sedimento, saturación de fluidos, resistencia al cizallamiento y tamaño del grano;

e) Estado de oxidación-reducción: profundidad a la que las condiciones del sedimento cambian de óxicas a subóxicas.

220. La información recopilada debe utilizarse para determinar las características del sustrato del lecho marino y los rasgos geomórficos, para conocer así en detalle las condiciones previas a la explotación de las zonas que se ha solicitado explorar.

## **F. Clasificación del hábitat**

221. Para facilitar otras iniciativas de muestreo, las descripciones cualitativas de las características geomórficas básicas, las clasificaciones de los hábitats y las perturbaciones no biogénicas debidas a la extracción de testigos deben cartografiarse a una escala adecuada a la variabilidad de los recursos y los hábitats, utilizando la terminología para la normalización de los nombres de los accidentes geográficos submarinos proporcionada por la Organización Hidrográfica Internacional (2019).

## **G. Calidad de los datos**

222. Los detalles sobre el aseguramiento de la calidad en las observaciones oceanográficas, incluidas las normas y orientaciones, se pueden encontrar en Bushnell *et al.* (2019), entre otros. Toda la metodología debe contrastarse con los planes de aseguramiento de la calidad (Simpson y Batley, 2016). Las orientaciones sobre el control de calidad de los levantamientos hidrográficos y las directrices para el procesamiento de los datos se encuentran en <https://iho.int/en/standards-and-specifications>.

## **H. Gestión de los datos**

223. En un depósito apropiado para ello, debe almacenarse un conjunto de testigos representativos de los sedimentos del fondo marino obtenidos antes de la explotación, junto con los metadatos adecuados, para su posterior comparación y, si es necesario, para la realización de pruebas adicionales.

224. Todas las observaciones deben registrarse en una hoja de trabajo siguiendo los formatos de datos convencionales. Deben ir acompañadas de fotografías de alta calidad en primer plano con escala de referencia.

225. En el Sistema de Mejores Prácticas Oceánicas (2020) se puede encontrar un modelo de documento de mejores prácticas sobre la gestión de datos. El modelo también puede descargarse de <https://repository.oceanbestpractices.org/handle/11329/1245>.

# **VII. Comunidades biológicas**

## **A. Introducción**

226. La base de referencia ambiental para las comunidades biológicas debe incluir datos espaciales y temporales sobre las comunidades pelágicas y bentónicas y sus funciones ecosistémicas, así como información sobre mamíferos marinos, aves, tortugas, peces y las grandes concentraciones de necton y plancton de la superficie. Los datos recogidos serán diversos y deberán ser lo bastante amplios para evaluar el posible impacto de la minería en el fondo marino y en la columna de agua.

227. Para definir las comunidades biológicas deben determinarse las siguientes variables:

a) Comunidades pelágicas: el sistema pelágico comprende toda la columna de agua, desde la superficie del mar hasta el fondo marino. Los organismos pelágicos abarcan desde las bacterias hasta las ballenas. El gran volumen de agua y los organismos que contiene se mueven a través de los posibles emplazamientos mineros, por lo que el muestreo debe extenderse más allá de la zona de impacto inmediato de la explotación, e incluir toda el agua y todos los organismos que entran, posiblemente interactúan y salen de la zona de impacto de la explotación;

b) Comunidades bentónicas: el bentos es la biota adulta que vive sobre los sedimentos o dentro de ellos, o cerca del fondo marino. Los organismos bentónicos abarcan desde bacterias y protistas hasta metazoos. La minería tiene un impacto directo sobre ellos en forma de eliminación o disgregación del hábitat, y un impacto indirecto en forma de aumento de la turbidez y redistribución de los sedimentos;

c) Conectividad: la comprensión de la diversidad genética, la biogeografía, los patrones de conectividad molecular, la restricción del hábitat y la endemidad, así como la rotación, es esencial para determinar la posible recuperación tras una perturbación;

d) Funcionamiento del ecosistema: el conocimiento del funcionamiento del ecosistema es necesario para comprender cómo las perturbaciones a pequeña escala pueden provocar cambios en la estructura de la red trófica y en el reciclaje de la materia orgánica por parte de la comunidad bentónica residente;

e) Ecotoxicología: los metales y otros contaminantes liberados durante las operaciones mineras pueden tener un impacto en la fisiología de los organismos; por ello es importante conocer su posible toxicidad;

f) Mamíferos marinos, tiburones, tortugas y necton de la superficie: es importante registrar la presencia de diversas especies en la zona general del contrato, en particular la presencia de especies protegidas sensibles, amenazadas o en peligro, ya que sus rutas migratorias estacionales pueden pasar por la zona. Hay que tener en cuenta la evaluación de su susceptibilidad al ruido y a determinadas frecuencias sonoras, las profundidades a las que pueden encontrarse y el impacto que pueden tener sobre ellas las operaciones mineras ligeras y futuras;

g) Aves marinas: las aves marinas son uno de los grupos de aves más amenazados del mundo. Su comportamiento se ve afectado por las instalaciones marinas. Son buenos indicadores de la salud general del ecosistema porque bioacumulan metales pesados y sustancias tóxicas.

## **B. Metodología general**

228. El muestreo temporal es necesario para captar la variabilidad estacional de los parámetros biológicos. Estos abarcan, entre otros, las concentraciones de metales y otros contaminantes en los tejidos, y se utilizan en los estudios de ecotoxicología. Otro factor que hay que tener en cuenta son los rasgos del ciclo vital, como las pautas de migración de las especies pelágicas que podrían pasar por la zona del contrato o la zona de referencia.

229. Para documentar la diversidad regional y los patrones de conectividad, puede ser necesario comparar especímenes recogidos a lo largo de toda una escala espacial, por ejemplo, de decenas a miles de kilómetros. Estas comparaciones pueden exigir el muestreo de lugares distantes como parte del establecimiento base de referencia, o pueden basarse en comparaciones con fuentes de datos de terceros.

230. Todas las identificaciones taxonómicas deben realizarse con la mejor resolución posible. Deben utilizarse muestras moleculares de las unidades taxonómicas para respaldar la identificación.

## C. Resolución del muestreo

### 1. Muestreo pelágico

231. En la zona pelágica, las comunidades biológicas se dividen por profundidad de la siguiente manera: la zona fótica, donde hay suficiente luz para la fotosíntesis del fitoplancton (0 a 200 m); la zona mesopelágica o crepuscular, en la que predominan los animales de las capas de dispersión de aguas profundas (200 a 1.000 m); y la zona batipelágica o interior del océano, que está habitada por organismos especializados de las profundidades oscuras del océano (más de 1.000 m). Dentro de esas zonas, existen capas más finas. En cambio, las distribuciones horizontales pueden ser bastante homogéneas a lo largo de cientos de kilómetros, salpicadas por transiciones en frentes oceánicos o sistemas de remolinos. Véase la subsección 5 sobre la microbiota para conocer los detalles relativos al muestreo y el análisis de los microorganismos en el ámbito pelágico.

232. Las muestras deben tomarse en estratos verticales dentro de cada bioma. En lugar de las muestras puntuales mencionadas en la sección III.A, los perfiles batimétricos deben extenderse desde la superficie hasta los 50 m; de 50 a 100 m de profundidad; de 100 a 200 m de profundidad; de 200 a 500 m de profundidad; de 500 a 1.000 m de profundidad; y de 1.000 m a 10 m por encima del fondo marino.

233. En particular, por debajo de los 1.000 m, más allá del alcance máximo de los sonares de los barcos, el muestreo con red puede mejorarse con sistemas de imagen. Entre estos se encuentran los perfiladores submarinos en video, que se hacen descender sobre un cable para obtener un perfil vertical, los sumergibles utilizados para la obtención de perfiles oblicuos, como describen Robison *et al.* (2013), y otros sistemas diversos utilizados para elaborar perfiles de bioluminiscencia, como describen Heger *et al.* (2008). Es probable que los ROV y los AUV adquieran importancia para estos estudios profundos.

### 2. Muestreo bentónico

234. El muestreo bentónico debe abarcar todas las variedades de tamaño, los diferentes sustratos (incluidos los sedimentos y los nódulos), la biogeoquímica (véase la sección V), el funcionamiento del ecosistema y la genética. Los detalles relativos a las variables específicas se proporcionan en las secciones siguientes.

235. Para el manejo de los dispositivos de muestreo y la manipulación de las muestras a bordo deben seguirse las siguientes prácticas recomendadas:

a) El equipo de muestreo de sedimentos debe posarse sobre el fondo marino con suavidad para minimizar el efecto de la onda de proa (despliegue desde el costado del barco, baja velocidad del cable, uso de telemetría);

b) Los testigos extraídos con sacatestigos de caja para muestrear la macrofauna no deben dividirse en submuestras. Las submuestras de un mismo testigo extraído con un sacatestigo de caja, y los distintos testigos obtenidos del despliegue de un sacatestigo múltiple, son pseudorrepeticiones y no deben considerarse verdaderas repeticiones (véase la sección III.A);

c) Las muestras y los especímenes deben mantenerse tan fríos como sea posible para mejorar la calidad del ADN (tamizar la muestra en una cámara frigorífica, clasificar en hielo y preferiblemente a bordo, conservar los especímenes

y los residuos del tamizado en etanol frío, mantener la cadena de frío durante el transporte y el almacenamiento de las muestras).

236. El número de muestras necesarias debe determinarse utilizando análisis de la potencia (Jumars, 1981) y curvas de rarefacción basadas en el muestreo exploratorio. Para la macrofauna, el muestreo exploratorio debe incluir de cinco a diez testigos por unidad fisiográfica. Estudios anteriores indican que se necesitan al menos 20 testigos de caja completos, pero que preferiblemente deberían utilizarse más de 30, a fin de obtener una base de referencia adecuada para una comparación estadística de la abundancia de macrofauna antes y después de la explotación de una unidad fisiográfica. El número real debe determinarse sobre la base de un análisis de la potencia y de las curvas de rarefacción específicas de la zona de investigación. En el caso de la megafauna, es necesario un análisis de la potencia para optimizar el diseño. Las secciones transversales deben diseñarse con el objetivo de encontrar más de 500 organismos individuales en cada sección; se deben obtener al menos cinco secciones transversales (Simon-Lledo *et al.* 2019).

237. Las estrategias de muestreo deben centrarse en las unidades fisiográficas que se verán directamente afectadas por la explotación minera (por ejemplo, las llanuras con una densa cobertura de nódulos), las unidades fisiográficas que pueden verse afectadas por impactos secundarios según indiquen otras variables (por ejemplo, las zonas en las que pueden depositarse los penachos) y los lugares de referencia adecuados.

#### **D. Variable medida: comunidades pelágicas**

238. La estructura vertical de la columna de agua debe describirse a partir de un sondeo acústico mediante un sistema a bordo (Simrad EK60 o equivalente) que funcione a múltiples frecuencias (18, 38, 70, 120 y 200 kHz), calibrado antes del inicio de cada viaje. Las secciones transversales deben ser analizadas tanto de día como de noche para estimar el biovolumen o la biomasa total, por ejemplo, 10 transecciones lineales en cada lugar, cada una de 8 millas náuticas con el barco moviéndose a 8 nudos (Cox *et al.*, 2013). Los datos deben procesarse para estimar la biomasa en función de la profundidad, y la biomasa total integrada desde la superficie hasta una profundidad de 1.000 m (Irigoién *et al.*, 2014). Las capas de dispersión del sonido deben determinarse y clasificarse mediante un análisis multifrecuencia para discriminar peces, calamares y crustáceos (Benoit-Bird *et al.* 2017). Los estudios con sonda acústica utilizando un Simrad EK60 o un dispositivo equivalente deben proseguir durante al menos tres ciclos de 24 horas para cuantificar la migración vertical diurna, tal y como describen Klevjer *et al.* (2016).

239. En la medida de lo posible, deben utilizarse puntos de referencia históricos accesibles mediante el examen de los datos mundiales de dispersión acústica disponibles en diversos archivos, como los centros mundiales de datos oceanográficos y los centros nacionales de datos; y los conjuntos mundiales de datos como Mesopelagic Biogeography (Proud *et al.*, 2017).

240. Los componentes de las comunidades pelágicas y la metodología de muestreo adecuada para cada uno de ellos son los siguientes:

a) Fitoplancton: la producción primaria (clorofila a) debe ser cartografiada en toda la zona de muestreo a partir de fuentes de imágenes multiespectrales por satélite adecuadas (AVHRR, SeaWiFS, MERIS y MODIS). El muestreo es necesario para calibrar y verificar las estimaciones satelitales de la producción primaria. Las repeticiones son necesarias para determinar la variación natural espacial y temporal.

Las muestras de agua recogidas con botellas Niskin en una sonda CTD proporcionan datos sobre el fitoplancton a distintas profundidades.

b) Zooplancton (meroplancton y holoplancton): el zooplancton debe muestrearse con redes para recuperar ejemplares de referencia que se identificarán y cuyo ADN se secuenciará; ha de llevarse a cabo un muestreo diferente para cada clase de tamaño. Las especies de macrozooplancton y mesozooplancton pueden clasificarse y cuantificarse mediante video de alta definición, imágenes acústicas activas (es decir, cámaras multihaz), fotomultiplicadores (para medir la bioluminiscencia), imágenes de alta definición y acústicas y sonares bioacústicos. Para determinar la composición de la comunidad, es importante calcular la distribución de las especies y la estructura del conjunto por zona de muestreo y sumar los datos de toda la zona usando imágenes de alta definición y acústicas. Pueden obtenerse datos complementarios a partir del ADN ambiental (secuenciadores *in situ* de ADN) (Danovaro *et al.* 2020), de la manera siguiente:

i) Zooplancton: el zooplancton debe muestrearse mediante redes, herramientas ópticas (por ejemplo, perfiladores submarinos en video) y AUV o ROV para evaluar y recuperar ejemplares de referencia con el fin de identificarlos y secuenciar su ADN; se debe hacer un muestreo diferente para cada clase de tamaño. Las redes utilizadas para el muestreo deben tener un tamaño de malla inferior a 1 mm; En aguas más profundas deben utilizarse redes tipo bongó o bombas de plancton, o con una red de apertura y cierre múltiple que permita tomar muestras de profundidades discretas en un solo remolque (véase [ISBA/25/LTC/6/Rev.1](#) junto con [ISBA/25/LTC/6/Rev.1/Corr.1](#)). Las redes deben estar equipadas con caudalímetros para medir el volumen muestreado, así como con sensores de profundidad y temperatura. Las muestras deben recogerse desde 100 m por encima del fondo marino hasta la superficie, con un mínimo de dos remolques en cada estación de muestreo.

ii) Necton mesopelágico: debe utilizarse una red más grande, como la red de macrozooplancton o “krill” descrita por Wenneck *et al.* (2008), que es una red de arrastre pelágica adecuada para capturar muestras representativas de peces de capa difusora, crustáceos y otros organismos en capas de profundidades discretas. Tiene cinco copos, cada uno equipado con un cubo de siete litros. También se pueden utilizar versiones más grandes del MOCNESS. Las muestras deben recogerse desde 100 m por encima del fondo marino hasta la superficie, con remolques horizontales a la profundidad de cada capa difusora, que deben observarse simultáneamente en la ecosonda para garantizar una orientación correcta. El procesamiento de las muestras se describe en Cook *et al.* (2013). Desde la superficie hasta los 200 m de profundidad se debe muestrear con redes; se recomienda utilizar una red con un copo cuyo tamaño de malla sea de 350  $\mu$  y una red con un copo cuyo tamaño de malla sea de 200  $\mu$ . En el caso de los sistemas de redes de apertura y cierre múltiples, los tamaños de malla pueden oscilar entre 64  $\mu$ m y 3 mm, dependiendo de la finalidad del estudio y los organismos objetivo.

iii) Zooplancton gelatinoso: el zooplancton gelatinoso constituye una alta proporción de la biomasa del plancton. Es abundante y diverso desde la zona epipelágica hasta la abisopelágica, incluida la capa límite bentónica. Los instrumentos ópticos (por ejemplo, perfiladores submarinos en video) o las secciones transversales obtenidas mediante AUV o ROV son la mejor forma de estudiar el zooplancton gelatinoso. Estos dispositivos deben colocarse a diferentes intervalos de profundidad en la columna de agua, de forma similar a las redes remolcadas.

iv) Plancton bentopelágico: la capa cercana al fondo puede muestrearse con redes de plancton, pero el uso de las redes requerirá montar sistemas emisores acústicos, medidores de profundidad o altímetros de precisión en los aparejos para reducir el riesgo de daños por contacto con el fondo marino. También puede muestrearse esta capa utilizando redes de plancton montadas en trineos remolcados sobre el fondo marino (por ejemplo, el “trineo Brenke”). Las muestras cuantitativas de zooplancton pueden recogerse mediante bombas de plancton amarradas cerca del fondo marino a alturas muy precisas sobre él; las trampas de sedimentos amarradas permitirán obtener muestras cualitativas de zooplancton;

c) Microbiota: la microbiota está compuesta por organismos invisibles a simple vista. Son más pequeños que los que integran la meiofauna. Definidos operacionalmente como de menos de 32  $\mu\text{m}$  de tamaño, abarcan el nanoplancton, los protistas, las bacterias, las arqueobacterias y los virus. Las comunidades microbianas de la columna de agua y de la capa de agua cercana al fondo pueden desempeñar una función crucial en los ciclos biogeoquímicos. Véase la sección E, subsección 5, para consultar las directrices de muestreo y análisis.

d) Necton: el necton comprende una amplia gama de tamaños, desde el pequeño micronecton (2 a 20 cm) hasta los grandes peces y calamares. El muestreo es diferente para cada clase de tamaño:

i) El necton pequeño debe recogerse con muestreadores de red, es decir, MOCNESS;

ii) Los elementos más grandes deben muestrearse utilizando redes de arrastre pelágicas para recoger los especímenes, así como métodos acústicos para estimar la biomasa y categorizar la capa difusora profunda.

241. Los distintos elementos del zooplancton deben caracterizarse hasta el nivel taxonómico más bajo posible. El holoplancton debe determinarse a nivel de especie. En el caso del meroplancton, puede ser necesario identificarlo de manera más general, por ejemplo, larvas de equinodermo, trocóforo de poliqueto, huevo, etc. El análisis molecular puede ayudar a identificar los taxones holoplanctónicos y meroplanctónicos.

242. Para todos los grupos de fauna, se debe obtener información de imágenes y taxonómica; se deben utilizar técnicas moleculares para determinar características genéticas que permitan la comparación taxonómica entre distintas zonas del contrato.

243. Los parámetros que deben medirse son la concentración de clorofila  $a$  ( $\mu\text{g l}^{-1}$ ), la composición y la biomasa del fitoplancton, la migración diurna del micronecton y del zooplancton, la abundancia, y la composición y la biomasa del zooplancton y de otros grupos de fauna.

244. A partir de estas mediciones y de las recogidas para otros parámetros, deben determinarse la productividad primaria, la densidad y la diversidad (univariante y multivariante) de los grupos de fauna, las clases de tamaño y los grupos funcionales.

## **E. Variable medida: comunidades bentónicas**

245. Los organismos bentónicos pueden dividirse en una serie de clases de tamaño y grupos funcionales. Aunque el muestreo debe seguir las mismas líneas generales siempre que sea posible, cada grupo está sujeto a consideraciones diferentes. Estos grupos son los siguientes:

a) Megafauna: organismos visibles en imágenes, generalmente de tamaño superior a 1 cm;

b) Macrofauna: normalmente anélidos, crustáceos anfípodos, tanaidáceos e isópodos, moluscos, equinodermos más pequeños, normalmente retenidos en una malla de 250 a 300  $\mu\text{m}$ . Las muestras abisales contienen, además, numerosos foraminíferos del tamaño de la macrofauna (Bernstein *et al.*, 1978) y grandes organismos de la meiofauna, como los nematodos, aunque estos no suelen estudiarse. Hessler y Jumars (1974) propusieron excluir de la macrofauna en sentido estricto los taxones más pequeños que están mejor representados en las muestras de la meiofauna; ese es el planteamiento adoptado en las presentes Directrices. Las poblaciones de las especies más grandes entre los taxones de la meiofauna pueden seguir siendo muestreadas con mayor precisión en la unidad de muestreo más grande que se suele utilizar para la macrofauna y pueden ser consideradas parte de la macrofauna en sentido laxo. En la zona de Clarion-Clipperton, la macrofauna en sentido estricto está dominada por dos grupos taxonómicos: los poliquetos y los tanaidáceos;

c) Meiofauna: generalmente nematodos, copépodos harpacticoides, ostrácodos, quinorrincos y otros pequeños invertebrados (la meiofauna metazoaria) retenidos en un tamiz de 32  $\mu\text{m}$ . Esta clase de tamaño también incluye abundantes foraminíferos de menor tamaño (la meiofauna foraminífera). Por razones prácticas, se los suele restringir a los retenidos en un tamiz de 150  $\mu\text{m}$ , 125  $\mu\text{m}$  o 63  $\mu\text{m}$ ;

d) Fauna vinculada a los nódulos polimetálicos: los nódulos son una fuente importante de estructura del hábitat bentónico en las zonas donde son abundantes. La epifauna de los nódulos está dominada por octocorales, esponjas, actiniarios y foraminíferos. La endofauna de los nódulos, que se encuentra en los sedimentos dentro de las grietas de los nódulos, está dominada por organismos de la meiofauna;

e) Microbiota: organismos invisibles a simple vista, más pequeños que la meiofauna. Desde el punto de vista operacional, se considera que tienen un tamaño inferior a 32  $\mu\text{m}$ ;

f) Detritívoros y peces demersales: animales móviles que suelen ser depredadores activos en la capa límite bentónica; también abarca a las especies que aprovechan los cadáveres de, por ejemplo, peces o ballenas que caen al fondo del mar.

## 1. Megafauna

246. La megafauna pertinente, en el sentido más amplio posible, para las operaciones mineras debe estudiarse mediante la obtención de imágenes a lo largo de transecciones lineales, repetidas dentro de estratos o unidades fisiográficas específicos. Siempre que sea posible, debe utilizarse la evaluación de imágenes a partir de fotografías (imágenes fijas) en lugar de videos (imágenes en movimiento), ya que ello facilita enormemente el análisis y el control de calidad. De las imágenes de video se pueden extraer fotogramas de muy buena calidad, pero la calidad de las fotografías es casi siempre superior. Siempre que sea posible, debe incluirse el video para evaluar la presencia de formas más raras y de gran movilidad (por ejemplo, peces) y para proporcionar múltiples ángulos de visión y observaciones del comportamiento.

247. Las cámaras fijas deben tener una resolución suficiente para mostrar de forma fiable la megafauna de más de 10 mm de tamaño con suficiente detalle (por ejemplo, cada cuadrado de 10 x 10 mm en el fondo marino está cubierto por 40 x 40 píxeles en la imagen). Además, los ajustes de exposición de las cámaras fotográficas deben poder controlarse manualmente. Para caracterizar de manera fiable la megafauna de más de 10 mm de tamaño, se puede utilizar el video si la resolución es suficiente (es decir, al menos 720p de alta definición; aproximadamente, 1 millón de píxeles por

imagen). Lo ideal es que las imágenes se obtengan en formato crudo, es decir, con los datos del sensor de imagen mínimamente procesados.

248. Para las imágenes del fondo marino, se debe usar una plataforma capaz de adquirir imágenes bien iluminadas y de alta resolución de una escala y calidad coherentes que permitan la identificación fiable de individuos de megafauna del tamaño determinado (normalmente 10 mm). Puede tratarse de una cámara remolcada o montada en un AUV, un ROV o un vehículo oruga submarino. La altitud del estudio debe mantenerse constante para que las imágenes se obtengan a una altitud constante sobre el fondo marino. La información de navegación de la plataforma de la cámara debe obtenerse automáticamente a intervalos regulares (por ejemplo, 1 Hz) mediante un sistema de transpondedor acústico.

249. La posición de inicio y la dirección de la transección deben ser aleatorias. Las transecciones deben repetirse. El número de repeticiones debe determinarse y justificarse mediante un análisis de la potencia estadística. Se deben obtener al menos cinco repeticiones para cada estrato objetivo (Simon-Lledo *et al.* 2019). Las transecciones deben ser independientes entre sí (es decir, una transección lineal larga no debe dividirse en segmentos adyacentes). Existen estrategias eficaces para obtener transecciones independientes; por ejemplo, se pueden obtener múltiples transecciones en línea recta en forma de zigzag. Las transecciones no deben cruzar las unidades fisiográficas.

250. La longitud de las transecciones debe determinarse utilizando los datos existentes para la región a fin de garantizar que en cada transección se encuentre una cantidad suficiente de organismos de la megafauna para hacer posible una evaluación eficaz y sólida de los parámetros de interés. Para evaluar la biodiversidad, las transecciones deben diseñarse con el objetivo de encontrar más de 500 organismos individuales en cada transección (Simon-Lledo *et al.* 2019).

251. La anchura de la transección debe calcularse en función de la altitud real de la imagen y suele ser de unos 2 m. Si se dispone de suficiente información de posicionamiento y de enfoques de muestreo espacialmente precisos, deben obtenerse transecciones adyacentes que se solapan para crear imágenes en mosaico y abarcar un área más amplia, siempre que la imagen en mosaico tenga suficiente resolución para hacer posible la identificación fiable de organismos de más de 10 mm de tamaño.

252. Se deben enumerar los taxones que no pueda determinarse que están vivos, como los invertebrados que viven en un caparazón o tubo (la mayoría de los taxones de poliquetos y gasterópodos). Puede ser necesario excluirlos del análisis cuantitativo.

253. Los xenofóforos (megafauna protista) deben analizarse por separado (Gooday *et al.*, 2017, 2020b). Su número suele ser varias veces superior al de la megafauna metazoaria.

254. Las transecciones de imágenes deben analizarse como unidades de muestra (es decir, todos los organismos registrados en cada transección deben sumarse para formar una única unidad de muestra), en el caso de la mayoría de los análisis.

255. Se debe determinar la escala de todas las imágenes mediante sistemas fotogramétricos utilizando las propiedades ópticas conocidas de la cámara, la posición de la cámara en el dispositivo de recogida, los registros del altímetro y los datos de alabeo y cabeceo del vehículo. Debe indicarse en el informe la superficie del fondo marino cubierta por el muestreo.

256. Las imágenes deben anotarse utilizando un programa informático de anotación especializado, como BIIGLE (Langenkämper *et al.*, 2017). Se puede utilizar cualquiera de las distintas herramientas de anotación de imágenes muy adecuadas

disponibles para el análisis de imágenes del fondo marino (Gomes-Pereira *et al.*, 2016; Schoening *et al.*, 2016).

257. Las imágenes deben analizarse en orden aleatorio (para minimizar cualquier sesgo relacionado con la secuencia o el tiempo). Todos los individuos de megafauna de más de 10 mm de tamaño deben ser detectados y anotados. Deben identificarse con la mayor resolución taxonómica posible, es decir, por morfotipo (unidad taxonómica operacional) para una identificación coherente, normalmente a nivel de género o familia (Howell *et al.*, 2019). Las dimensiones físicas de cada individuo deben calcularse a partir de los tamaños de las imágenes en píxeles.

258. En la medida de lo posible, la observación de las especies en fotos o grabaciones de video debe verificarse mediante el análisis taxonómico o genético de varios ejemplares recogidos. Estudios recientes han puesto de manifiesto que algunas especies de megafauna, como los ofiuroideos, pueden comprender complejos de especies (por ejemplo, Christodoulou *et al.*, 2020).

259. Los resultados deben presentarse de forma que se facilite su uso futuro y su comparación con otros estudios, lo que permitirá integrar los datos en evaluaciones regionales y de otro tipo. Normalmente, para ello se deben proporcionar matrices de abundancia de morfoespecies y valores de densidad (números por m<sup>2</sup>), números de diversidad de Hill de orden 0, 1 y 2 (0: riqueza de morfoespecies [S]; 1: la forma exponencial del índice de Shannon [exp H']; 2: la forma inversa del índice de Simpson [1/D]) y una evaluación multivariante (lo ideal es que incluya datos anteriores para compararlos).

260. Los parámetros que deben medirse son las abundancias numéricas de especímenes por superficie muestreada (individuos por m<sup>2</sup>) de los grupos taxonómicos o funcionales apropiados y de toda la comunidad de metazoos o xenofióforos. Además, se debe registrar el tamaño de cada individuo encontrado y cualquier observación de los detalles de su ubicación (por ejemplo, si estaba unido a un nódulo).

261. A partir de esas mediciones, hay que determinar la densidad, los valores estadísticos para describir la estructura de la comunidad (medidas de diversidad univariante y multivariante) y los patrones de distribución. Los resultados deben incluir mapas o zonas visualizadas, incluida posiblemente la extensión de los hábitats del fondo marino estudiados.

## 2. Macrofauna

262. El muestreo de la macrofauna debe realizarse siguiendo la metodología descrita en el documento de la Autoridad titulado *Technical Study No. 13: Deep Sea Macrofauna of the Clarion-Clipperton Zone*. Se puede encontrar más información en [ISBA/25/LTC/6/Rev.1](#) junto con [ISBA/25/LTC/6/Rev.1/Corr.1](#).

263. Debe recogerse tanto la macrofauna que vive en los nódulos como la que se encuentra en los sedimentos. Una vez a bordo, se debe fotografiar la superficie del testigo después de haber succionado el agua suprayacente sobre un tamiz utilizando un tubo de plástico. El residuo del tamiz del agua suprayacente debe procesarse junto con los sedimentos superficiales.

264. En el caso de la fauna unida a los nódulos, cuando se recuperan los testigos del sacatestigos de caja, debe identificarse la epifauna evidente adherida a la superficie del nódulo. Se debe fotografiar la fauna de los nódulos cuando aún está adherida a los nódulos en pequeños acuarios especiales con agua de mar filtrada y fría (4 °C); se debe eliminar la fauna; se toma un fragmento de muestra para analizar el ADN en un tubo de 2 ml con etanol frío al 96% (-20 °C) y se fija el organismo en un tubo aparte.

El nódulo debe devolverse al contenedor original. Toda el agua que haya estado en contacto con los nódulos se tamizará con un tamiz de 32  $\mu\text{m}$  y el residuo se añadirá al contenedor original. El tamaño y el peso de los nódulos deben registrarse antes de conservarlos en formol o etanol frío.

265. En el caso de la fauna sedimentaria, todo el procesamiento debe realizarse en un laboratorio frío. El agua superficial del sacatestigos debe ser succionada en un tamiz (250  $\mu\text{m}$  o 300  $\mu\text{m}$ ) y se deben tomar fotografías de la superficie del testigo intacto y de la sección transversal, tomando nota de cualquier bioturbación y de la profundidad de cualquier cambio en el color del sedimento para detectar los cambios verticales en el tipo de sedimento. El sedimento debe dividirse en capas de las siguientes profundidades: 0-3 cm, 3-5 cm y 5-10 cm. Cada capa debe tamizarse con agua de mar filtrada y fría. La parte superior de la muestra debe clasificarse inmediatamente y el residuo de los cortes más profundos debe conservarse en un laboratorio frío en agua de mar filtrada y fría hasta que se procesen esos cortes. Cada vez es más frecuente que las muestras se usen para hacer análisis morfológicos y moleculares; por ello, el uso de formaldehído como fijador debe considerarse cuidadosamente, ya que puede imposibilitar el análisis molecular de las muestras. Para el análisis morfológico y molecular, en el laboratorio refrigerado (4 °C), las capas de 0-3-cm y 3-5-cm del sedimento se tamizarán con agua de mar filtrada y fría y los residuos se conservarán en formaldehído tamponado al 10 % o en etanol al 96 %. En el laboratorio, la capa de 5-10 cm del sedimento se tamiza con agua de mar filtrada y fría y los residuos se fijan en formaldehído tamponado al 10 % o en etanol al 96 %. Si hay grandes volúmenes de residuos, pueden ser necesarias concentraciones más altas de formaldehído para garantizar la fijación de los especímenes. Las soluciones de formaldehído no deben utilizarse para fijar grupos de crustáceos como los isópodos y los tanaidáceos; para esos taxones, se aconseja la conservación en etanol preenfriado al 96 %. Las muestras deben fijarse en una solución de formaldehído durante al menos 24 horas. Tan pronto como sea posible, todas las muestras deben transferirse de las soluciones de formaldehído a una solución de etanol al 70-80 %.

266. Para los estudios moleculares, morfológicos y de biodiversidad, los residuos de la capa superior, de 0 a 3 cm, deben ser tamizados y conservados y la muestra debe mantenerse lo más fría posible, clasificando todos los metazoos en grupos taxonómicos fácilmente identificables sobre un “lecho de hielo”. Se deben tomar imágenes en vivo de los especímenes antes de conservarlos en etanol. Puede utilizarse DESS (Yoder *et al.* 2006) para conservar los nematodos. Las demás capas se tamizarán y los residuos se examinarán como se ha descrito anteriormente o se conservarán en etanol al 96 %. Los poliquetos deben conservarse en etanol frío al 80 %, los nematodos en DESS (y almacenarse a 4 °C) y todos los demás grupos, en etanol frío al 96 %. El etanol debe cambiarse después de 24-48 horas y las muestras deben almacenarse a -20 °C.

267. Los parámetros que deben registrarse son la clasificación taxonómica de cada morfoespecie, las especies por matriz de estación mostrando la abundancia (individuos por muestreador) y las secuencias genéticas.

268. A partir de esas mediciones, hay que determinar la densidad, la riqueza de especies, los valores estadísticos para describir la estructura de la comunidad (medidas de diversidad univariante y multivariante) y los patrones de distribución.

### 3. Meiofauna (incluida la meiofauna foraminífera)

269. La meiofauna metazoaria debe muestrearse utilizando la metodología descrita en el documento de la Autoridad titulado *Technical Study No. 7: Marine Benthic Nematode Molecular Protocol Handbook (Nematode Barcoding)*.

270. Para analizar la biodiversidad, la meiofauna debe limitarse a los taxones de la fauna de los sedimentos comúnmente reconocidos como meiofauna, como los nematodos, los copépodos harpacticoides o los quinorrincos. Los taxones de la macrofauna (por ejemplo, poliquetos y tanaidáceos) capturados en las muestras de meiofauna pueden anotarse pero no deben incluirse en las estimaciones de abundancia de meiofauna.

271. Por cada despliegue de un sacatestigos múltiple, al menos un testigo debe dedicarse a la caracterización morfológica de la meiofauna metazoaria, y otro testigo a la caracterización morfológica de los foraminíferos. Deben asignarse otros testigos a la caracterización molecular de esos grupos y de otros eucariotas de pequeño tamaño (por ejemplo, pequeños protistas desnudos) (Gooday *et al.*, 2020a) mediante códigos o metacódigos de barras. La técnica de los metacódigos de barras puede aplicarse a la meiofauna extraída de los sedimentos o a muestras de sedimentos como tales; estas últimas constituirían muestras de ADN ambiental.

272. Si los nódulos son abundantes, pueden alterar el sedimento como consecuencia del movimiento durante la extracción de los testigos, causando diversos grados de alteración. Por ello, antes de cada despliegue deben priorizarse los análisis asignando los testigos menos perturbados a los análisis de mayor prioridad y rotando los rangos de prioridad entre los despliegues.

273. Una vez a bordo, todos los testigos deben ser fotografiados antes de nada. El agua suprayacente del testigo para el análisis de la meiofauna metazoaria debe succionarse sobre un tamiz de 32  $\mu\text{m}$  con el uso de un tubo de plástico; el residuo del tamiz debe procesarse junto con los sedimentos superficiales. El corte del testigo debe determinarse sobre la base de una inspección visual. Normalmente, la presencia de nódulos impide el corte, en cuyo caso se puede conservar toda la sección de 0-5 cm del testigo sin cortar. Los nódulos también pueden extraerse, y los testigos cortarse usando una placa de corte para crear las siguientes capas: 0-1 cm, 1-2 cm, 2-3 cm, 3-4 cm, 4-5 cm (las profundidades identificadas en la sección III.A, pero sin bajar más de 5 cm en el sedimento).

274. El testigo utilizado para el análisis de los foraminíferos debe cortarse como se ha descrito anteriormente y cada corte del sedimento debe conservarse por separado en una solución de formaldehído al 4 % tamponada con bórax (= 10 % de formol).

275. Deben mencionarse explícitamente la temperatura y la solución química utilizadas para la conservación de las muestras de meiofauna (tipo y concentración). El análisis previsto determina el tipo de conservación que necesita la muestra. Por ejemplo, las muestras para el estudio morfomolecular (es decir, el código de barras) deben conservarse en una solución que contenga DESS (Yoder *et al.*, 2006) a 4 °C. Las muestras conservadas de este modo pueden utilizarse para estudiar las características morfológicas (es decir, mantenerlas como muestras de referencia) mientras se deja abierta la posibilidad de extraer material genético del mismo espécimen (es decir, el código de barras del ADN), estableciendo así un vínculo entre la morfología y la identificación molecular (Bhadury *et al.*, 2006). Las muestras para el análisis del metacódigo de barras deben ser congeladas al menos a -20 °C inmediatamente después del muestreo (Macheriotou *et al.*, 2020). Además, las muestras deben conservarse en una solución de formaldehído y agua de mar al 4-8 % tamponada con bórax, pero esos especímenes solo pueden utilizarse para el análisis morfológico. Al menos un testigo debe submuestrearse para obtener el metacódigo de barras de los eucariotas de pequeño tamaño (protistas y metazoos). De cada testigo se tomarán tres submuestras de sedimento (de aproximadamente 2 ml de volumen) con una cuchara estéril, que se colocarán directamente en viales de plástico con 5 ml de una solución adecuada para conservar el suelo y se almacenarán a -20 °C. Los

nódulos que se encuentren se conservarán por separado para el posterior análisis de la fauna unida a los nódulos.

276. Una vez en el laboratorio, las muestras deben procesarse utilizando cualquier procedimiento normalizado de extracción de meiofauna. Para la meiofauna metazoaria, debe seguirse el método de flotación y centrifugación (por ejemplo, a 1.905 rcf), ya que se sabe que así se recupera hasta el 80 % o más de la fauna (McIntyre y Warwick, 1984). Debido a que la flotación genera resultados incoherentes, las muestras de foraminíferos deben ser clasificadas a mano. Hay que procurar incluir el componente de una sola cámara (monotálamo) de “concha blanda” en las evaluaciones de la biodiversidad, ya que son abundantes y predominan entre la diversidad de foraminíferos en las muestras de la zona de Clarion-Clipperton y del océano Índico. Sin embargo, a efectos de seguimiento, el análisis puede centrarse en los taxones multicámara de caparazón duro, que son menos abundantes y diversos, pero más conocidos y cuyo estudio requiere menos tiempo que el de los monotalámidos (el conocido como planteamiento micropaleontológico).

277. En los estudios sobre foraminíferos se suelen utilizar tamices con mallas de 150, 125 y 63  $\mu\text{m}$ . La elección del tamaño de la malla supone un equilibrio entre el mayor esfuerzo necesario para analizar los residuos de tamaño más fino y el mayor número de especies y datos que arrojan las fracciones más finas (Gooday y Goineau, 2019). Se recomienda un tamiz de malla de 125  $\mu\text{m}$  para su uso general en los estudios de biomonitorización (Schönfeld *et al.*, 2012), pero la fracción de 63  $\mu\text{m}$  puede aportar información adicional sobre especies ambientalmente sensibles (Lo Giudice Capelli y Austin, 2019), mientras que la fracción de 150  $\mu\text{m}$  retiene diversos monotalámidos de mayor tamaño poco representados en fracciones más finas (Goineau y Gooday, 2017, 2019). Lo ideal es analizar las tres fracciones (> 150  $\mu\text{m}$ , 125-150  $\mu\text{m}$ , 63-125  $\mu\text{m}$ ), pero si no es posible hacerlo, se utilizará sistemáticamente una fracción (> 150  $\mu\text{m}$ , > 125  $\mu\text{m}$  o > 63  $\mu\text{m}$ ).

278. Los residuos del tamiz para el análisis morfológico deben teñirse en una solución de rosa de bengala (puede disolverse 1 g en 1 l de agua del grifo), por ejemplo, colocando el tamiz que contiene el residuo en un plato con solución colorante durante la noche y luego lavando el residuo en el tamiz para eliminar el exceso de colorante. La clasificación de los foraminíferos debe realizarse en agua, en una placa de Petri, por ejemplo. Los monotalámidos delicados deben retirarse de la placa con una pipeta y guardarse en glicerol en portaobjetos de cristal, dejando los portaobjetos al descubierto para que los especímenes sigan siendo accesibles. Las especies más sólidas de cáscara dura deben guardarse en portaobjetos micropaleontológicos secos. Para más detalles sobre el procesamiento de las muestras de foraminíferos, en particular la división en húmedo y el tamizado de los sedimentos, la distinción de los especímenes “vivos” de los muertos y el problema de la fragmentación, deben consultarse Goineau y Gooday (2017, 2019) y Gooday y Goineau (2019). Dichos artículos y su material complementario incluyen numerosas fotografías de monotalámidos comunes y mayoritariamente no descritos. Schönfeld *et al.* (2012) y Alve *et al.* (2016) deben utilizarse para las recomendaciones relativas al planteamiento micropaleontológico del uso de foraminíferos multicámara en los estudios de seguimiento.

279. Los parámetros que deben registrarse son las listas de especies o géneros, las especies o géneros por matrices de estaciones que muestran la abundancia (densidad) por 10  $\text{cm}^2$  y las secuencias de genes.

280. A partir de esas mediciones, se deben determinar la densidad y los valores estadísticos que describen la estructura de la comunidad (medidas de diversidad univariante y multivariante).

#### 4. Fauna unida a los nódulos polimetálicos

281. El hecho de que los nódulos tengan una tasa de crecimiento extremadamente lenta significa que, una vez eliminados, pasarán millones de años antes de que se restablezca ese sustrato duro. Por ello, es importante determinar hasta qué punto las especies son compartidas entre los sedimentos blandos y los nódulos en los campos de nódulos abisales, y sus funciones o roles en ese hábitat.

282. Las muestras deben recogerse con un sacatestigos de caja (área de muestreo de un mínimo de 0,25 m<sup>2</sup>), un ROV o cualquier otro dispositivo bentónico similar que pueda recoger muestras de sedimentos y nódulos inalterados.

283. Todos los nódulos polimetálicos presentes en el sedimento deben ser retirados cuidadosamente, fotografiados y examinados para detectar la presencia de epifauna. El tratamiento posterior depende de la fauna que se investigue.

284. Todos los organismos de epifauna adheridos a la superficie exterior de los nódulos deben ser fotografiados inmediatamente, retirados cuidadosamente del nódulo y almacenados en etanol al 96 % para su posterior análisis microscópico y de laboratorio. A continuación, la superficie de cada nódulo se lavará por separado en un tamiz de malla de 32 µm; el material tamizado debe considerarse parte de la fauna sedimentaria ambiental. El sedimento blando del nódulo debe lavarse por separado, preferiblemente en un tamiz de malla fina (20-25 µm), y el material tamizado debe considerarse parte de cada capa de sedimento que contenga fauna. En el caso de la meiofauna metazoaria de las grietas de los nódulos, los nódulos deben lavarse cuidadosamente para eliminar los sedimentos adheridos, y deben medirse y pesarse. Los nódulos limpios deben romperse mecánicamente si es necesario y fijarse, por ejemplo, en formaldehído tamponado o DESS para las investigaciones morfológicas y moleculares, teniendo en cuenta que la fijación puede afectar a la integridad física del nódulo. A continuación la muestra puede procesarse utilizando cualquier procedimiento normalizado de extracción de meiofauna. No obstante, se recomienda seguir un método de flotación y centrifugación (por ejemplo, a 1.905 ref), ya que se sabe que así se recupera hasta el 80 % o más de la fauna (McIntyre y Warwick, 1984). A continuación, el sobrenadante debe lavarse en un tamiz de malla de 20-32 µm. El residuo del tamiz debe examinarse cuidadosamente con un estereomicroscopio (con 40 aumentos). Todos los organismos de la fauna deben identificarse hasta el nivel taxonómico más bajo posible, contarse, clasificarse y almacenarse por separado en DESS a 4 °C para que puedan ser utilizados posteriormente para la identificación molecular.

285. Para los estudios de foraminíferos, los nódulos deben tomarse de la superficie de los testigos extraídos con sacatestigos de caja o sacatestigos múltiples, colocarse en recipientes separados y conservarse en una solución de formaldehído al 4 % tamponada con bórax (10 % de formol). Deben utilizarse frascos de boca ancha para poder extraer fácilmente los nódulos sin dañar los delicados foraminíferos incrustados. En el laboratorio, los nódulos deben lavarse cuidadosamente, si es necesario, echando agua en la superficie con una pipeta para eliminar cualquier sedimento adherido. Sin embargo, el lavado debe ser mínimo y los nódulos deben manipularse con el mayor cuidado y lo menos posible. Una vez limpios, los nódulos deben colocarse en un recipiente con agua lo bastante profundo para cubrirlos por completo y examinarse con un estereomicroscopio equipado con una cámara digital. Los foraminíferos suelen ser más comunes en las superficies superiores y pueden concentrarse en los puntos más altos, pero también pueden encontrarse en las superficies inferiores. Los diferentes morfotipos deben fotografiarse para crear un catálogo que documente su diversidad. En la medida de lo posible, debe registrarse el número de ejemplares de cada tipo. Sin embargo, esto es difícil de hacer para algunas

formas, como las grandes formaciones reticuladas y los sistemas tubulares con límites poco definidos.

286. Los parámetros que deben registrarse son las listas de identificación taxonómica al nivel más bajo posible (a ser posible, el nivel de especie), la abundancia por nódulo (volumen/peso del nódulo) y las secuencias genéticas.

287. A partir de esas mediciones, hay que determinar la densidad y los valores estadísticos para describir la estructura de la comunidad (medidas de diversidad univariante y multivariante) y los patrones de distribución.

## 5. Microbiota

288. Las muestras de sedimentos deben recogerse con un sacatestigos de empuje manipulado mediante un ROV, un sacatestigos de empuje sumergible tripulado, un sacatestigos de caja, un sacatestigos de caja guiado por TV, un sacatestigos múltiple o un sacatestigos múltiple guiado por TV; el muestreador sellado debe estar tan cerca del punto de recogida como sea posible para evitar la contaminación durante la recuperación.

289. Las muestras de agua deben recogerse utilizando una roseta de CTD equipada con un muestreador de agua, o utilizando una unidad *in situ* para la filtración y extracción de partículas, como el sistema de transferencia de agua McLane; el muestreador sellado debe estar tan cerca del punto de recogida como sea posible para evitar la contaminación durante la recuperación. Las muestras deben recogerse en las capas de agua importantes, tal como se define en el muestreo de la columna de agua (véase la sección V). Entre las capas que se deben muestrear se encuentran la capa superficial, la capa máxima de clorofila subsuperficial, la capa anóxica y la capa cercana al fondo.

290. Las muestras para los métodos de cultivo deben almacenarse a 4 °C. Las muestras para los métodos independientes del cultivo deben almacenarse a -80 °C o en nitrógeno líquido (después de ser filtradas mediante un dispositivo de filtración de microbios con película de microfiltración en el caso de las muestras de agua).

291. Debe obtenerse un recuento microbiano utilizando un método de tinción fluorescente con colorantes específicos para el ADN (por ejemplo, DAPI) o utilizando un método de RCP en tiempo real con cebadores de oligonucleótidos específicos para cada grupo (Labrenz *et al.*, 2004). Cuando se utilicen técnicas de cultivo, deben aplicarse a bordo del buque de muestreo.

292. El ADN microbiano debe obtenerse siguiendo el método de extracción de ADN con fenol y cloroformo o con la ayuda de equipos de extracción de ADN; deben utilizarse la espectrofotometría (Qbit, nanodrop) y la electroforesis del ADN en gel de agarosa para detectar la pureza y la integridad del ADN, respectivamente. El ADN microbiano seleccionado debe secuenciarse en una plataforma de secuenciación de alto rendimiento (por ejemplo, Hiseq X, NovaSeq, Sequel II, MinION, GridION, PromethION y MiSeq para el metacódigo de barras). Se debe realizar una secuenciación adicional de amplicones para los genes marcadores importantes (por ejemplo, el gen 16S del ARNr, los genes funcionales).

293. El ARN microbiano deben obtenerse utilizando equipos de extracción de ARN o reactivos similares lo antes posible tras la recuperación de la muestra; deben utilizarse la espectrofotometría y la electroforesis del ARN en gel de agarosa para detectar la pureza y la integridad del ARN, respectivamente. El ARN microbiano seleccionado debe secuenciarse en una plataforma de secuenciación de alto rendimiento. Además, deben analizarse determinados ARN usando el método de RCP en tiempo real con cebadores de oligonucleótidos específicos.

294. Actualmente no existe un método normalizado para los análisis que conllevan una secuenciación de alto rendimiento. Los métodos comúnmente aceptados son: FastQC para el control de calidad; SPAdes para el ensamblaje de las lecturas de secuenciación; MetaBAT 2 para el agrupamiento de cóntigos; DADA2 para la generación de variantes de secuencias de amplicones; BLAST+ para la alineación de secuencias y la anotación de genes; CheckM para evaluar la calidad del ensamblaje y el agrupamiento (Breitwieser *et al.*, 2017).

295. Deben facilitarse los resultados del análisis de la secuenciación del genoma o del agrupamiento metagenómico de la población microbiana.

296. Los parámetros que deben registrarse son la identificación, la abundancia y las secuencias genéticas.

297. A partir de esas mediciones, se deben determinar la diversidad microbiana, la composición de la comunidad, la abundancia y las diferencias funcionales de los distintos grupos.

## 6. Detritívoros y peces demersales

298. Deben utilizarse dos o más de las tres categorías principales de muestreo: redes de arrastre de fondo, sistemas con cebo y transecciones de imágenes. Hay que tener en cuenta que las transecciones de video y las imágenes recogidas por los ROV, los AUV o las cámaras sumergidas no son ideales para el muestreo de peces, ya que pueden atraer o disuadir a las especies y, por tanto, sesgar su composición y su abundancia. Para las transecciones de imágenes, se debe seguir el planteamiento descrito en la subsección 1. Las redes de arrastre de fondo pueden remolcarse de forma independiente o detrás de un trineo con cámara, y las capturas proporcionan especímenes de referencia para la taxonomía y la secuenciación del ADN. Las trampas y los palangres tienen la desventaja de que son selectivos para las especies y, por tanto, no deben utilizarse para los estudios de biodiversidad. Las cámaras con cebo montadas en plataformas sobre el fondo generan un muestreo no sesgado de la fauna que acude a los cebos en una zona determinada. En el caso de los anfípodos, se pueden colocar pequeñas trampas para pececillos en las patas de la plataforma con cámara para capturar especímenes de referencia (Jamieson, 2015).

299. Una desventaja de los sistemas de cámaras es que suele ser difícil distinguir las especies en las imágenes, pero si se utilizan, deben realizarse un mínimo de 10 lanzamientos de cámara con cebo en cada zona de muestreo. Una desventaja del muestreo con redes de arrastre de fondo es que las redes de arrastre de estudio pueden tener un impacto negativo en las especies y los hábitats bentónicos vulnerables (Duran Munoz *et al.*, 2020).

300. Los parámetros que deben registrarse son las listas de identificación taxonómica al nivel más bajo posible (a ser posible, el nivel de especie), la abundancia, las secuencias genéticas (si se recogen muestras), el tamaño de los individuos, el momento de la llegada tras poner el cebo y el número máximo de individuos observado para cada especie (en el caso de las plataformas con cebo).

301. A partir de esas mediciones, hay que determinar la densidad, la riqueza de especies, los valores estadísticos para describir la estructura de la comunidad (medidas de diversidad univariante y multivariante) y los patrones de distribución.

## F. Variable medida: conectividad

302. Deben realizarse estudios de conectividad de las poblaciones para las especies clave utilizando muestras de varias ubicaciones geográficas o hábitats. Para cada

especie, el número de individuos de cada población debería ser, en teoría, relativamente grande (> 10-20 individuos por ubicación), de modo que solo se evalúen las especies relativamente abundantes y se utilicen como indicadores del conjunto más amplio. Sin embargo, dada la densidad relativamente baja de algunas especies que se encuentran en la zona de Clarion-Clipperton, incluso un número menor (3-5 individuos por ubicación) debería seguir siendo suficiente para realizar estudios de conectividad (Taboada *et al.*, 2018).

303. Dependiendo del entorno, para recoger un número suficiente de individuos con el fin de realizar estudios de conectividad, puede ser necesario usar muestreadores adicionales a los indicados anteriormente. Por ejemplo, pueden ser necesarios métodos de recogida como los trineos epibentónicos en hábitats bentónicos para garantizar la recogida de suficientes individuos de macrofauna. Sin embargo, estos métodos deben evitarse cuando puedan tener un impacto negativo en elementos delicados. Las muestras para los estudios de conectividad deben recogerse y almacenarse para preservar el ADN en las mejores condiciones posibles, como detallan Glover *et al.* (2016). Cuando se conservan especímenes grandes o partes de especímenes grandes, se debe utilizar etanol al 96 % en lugar de etanol al 80 %.

304. Para el análisis, debe utilizarse el planteamiento de taxonomía inversa (Janssen *et al.*, 2015). Deben conservarse ejemplares de referencia de los especímenes estudiados, ya que es necesario un examen más detallado de los caracteres morfológicos (por ejemplo, mediante técnicas de microscopía electrónica de barrido) para distinguir las especies crípticas determinadas molecularmente.

305. La selección de los marcadores moleculares adecuados depende del taxón seleccionado. En algunos casos, los métodos normalizados, como el uso de los marcadores moleculares más comunes (por ejemplo, el gen COI, el gen 16S del ARNr), pueden no revelar una variabilidad genética suficiente para permitir un análisis más profundo. Se debe adoptar un planteamiento combinado mediante el uso de marcadores moleculares comunes y marcadores de tipo microsatélite, incluidos los microsatélites altamente polimórficos (Taboada *et al.*, 2018), que pueden utilizarse para estudios a pequeña escala.

306. Además de los microsatélites para los estudios de genética de poblaciones, deben explorarse otras técnicas moleculares, como el uso de polimorfismos de un solo nucleótido generados a partir de estudios de representación reducida del genoma que pueden aplicarse fácilmente a organismos no modelo a un costo relativamente bajo. Por ejemplo, con ddRADseq se pueden generar entre cientos y miles de polimorfismos de un solo nucleótido, lo que permite no solo hacer estudios de genómica poblacional detallados, sino también investigar la filogenómica, las estrategias de adaptación o la introgresión, entre otros procesos poblacionales (Andrews *et al.*, 2016).

307. Deben aplicarse planteamientos de modelización en los que se utilice todo un abanico de herramientas disponibles. Los patrones de flujo genético y migración deducidos a partir de los datos genéticos deben compararse con factores ambientales como las corrientes oceanográficas. El uso de modelos oceanográficos para estimar el transporte de larvas (véase la sección IV, apartado D) puede explicar algunos patrones de diferenciación poblacional a gran escala y la conectividad de la especie (Taboada *et al.*, 2018; Kenchington *et al.*, 2019).

308. Dado que continuamente se están desarrollando diversos programas informáticos, los resultados de los estudios de referencia deben incluir una indicación clara de las herramientas utilizadas en los análisis y de los supuestos de los que se parte.

309. A partir de estos estudios, se debe determinar la conectividad y la biogeografía para las especies clave de cada agrupación funcional y se debe inferir para los conjuntos más amplios.

310. Entre las métricas específicas que deben determinarse se encuentran las siguientes:

a) Distancia genética mínima, utilizando redes de haplotipos, partiendo de la distancia  $p$  no corregida y los modelos de dos parámetros de Kimura entre especies y dentro de las especies para establecer la distancia genética intraespecífica e interespecífica;

b) En cuanto a la diversidad genética, hay que calcular la heterocigosis esperada ( $H_e$ ) y observada ( $H_o$ ) y los coeficientes de endogamia ( $F_{IS}$ ) para cada especie, estación de muestreo y región, utilizando paquetes R o, por ejemplo, el programa Genodive (Meirmans y Van Tienderen, 2004);

c) Para la estructura de la población, debe utilizarse una de las siguientes opciones:

i) Métodos de agrupamiento como el determinado mediante los programas Structure (Pritchard *et al.*, 2000) y DAPC; este último está incluido en el paquete R adegenet (Jombart *et al.*, 2010), que representa gráficamente las afinidades genéticas entre las muestras;

ii) Los métodos de distancia, como el valor estadístico del índice de fijación ( $F_{ST}$ ), deben aplicarse para medir el grado de diferenciación genética entre las poblaciones, utilizando valores de  $F_{ST}$  pareados para comparar los lugares y las regiones de muestreo; el análisis de la varianza molecular debe utilizarse para determinar la distribución jerárquica de la variación genética;

d) En el caso de los patrones de migración, se debe utilizar la función divMigrate del paquete R diveRsity (Keenan *et al.*, 2013) para estimar la migración relativa contemporánea entre las estaciones de muestreo. Como alternativa, se pueden utilizar los programas Lamarc (Kuhner, 2006) o Migrate (Beerli y Palczewski, 2010) para calcular los patrones de migración;

e) Aislamiento por distancia y rupturas genéticas: debe efectuarse una prueba de Mantel que correlacione las distancias geográficas con los valores transformados logarímicamente y esté correlacionada con la estimación pareada y linealizada de Slatkin  $F_{ST}$  ( $F_{ST}/1-F_{ST}$ ), utilizando diferentes paquetes R o usando programas como Genodive; además, la presencia de posibles barreras para determinar la estructura genética de las poblaciones debe evaluarse utilizando programas como Barrier (Manni *et al.*, 2004).

## G. Variable medida: funcionamiento del ecosistema

311. Las muestras de endofauna (un mínimo de 10 a 12 lugares seleccionados al azar) destinadas a analizar la abundancia de isótopos naturales para estudiar la estructura de la red alimentaria deben tomarse, en el caso de la meiofauna, a 0-1 cm y 1-2 cm y, en el caso de la macrofauna, a 0-1 cm, 1-5 cm y 5-10 cm. La megafauna debe muestrearse para estudiar la abundancia de isótopos naturales siempre que sea posible, de manera que se obtengan muestras de al menos diez individuos de un taxón particular (por ejemplo, *Ophiuroidea*). Los experimentos de marcaje con isótopos deben llevarse a cabo en un mínimo de diez sitios seleccionados al azar y se deben repetir las mediciones con cámara bentónica en cada sitio (Sweetman *et al.*, 2019).

312. Para analizar los isótopos estables, la meiofauna debe muestrearse utilizando sacatestigos de gran tamaño o sacatestigos múltiples, y se deben obtener muestras desde la capa de 0,5 cm. Los sedimentos deben almacenarse congelados (a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  o menos temperatura) sin ningún tipo de conservante hasta su posterior análisis en el laboratorio. Deben tamizarse en un tamiz de  $32\text{ }\mu\text{m}$  con agua de mar filtrada y fría. La macrofauna se recogerá con un sacatestigo de caja de  $0,25\text{ m}^2$  y se tomarán muestras a 0-1 cm, 1-5 cm y 5-10 cm de profundidad del sedimento; los cortes sedimentarios deben tamizarse con una malla de  $300\text{ }\mu\text{m}$  usando agua de mar filtrada y fría. Como alternativa o complemento, se puede usar un trineo epibentónico para recoger muestras de macrofauna a fin de analizar los isótopos estables.

313. Las muestras para analizar la estructura básica de la red alimentaria de la endofauna (por ejemplo, el número de niveles tróficos) deben recogerse en los mismos lugares que las muestras destinadas a analizar la estructura de la comunidad de meiofauna y macrofauna. Las muestras deben tomarse en, al menos, 10 o 12 lugares seleccionados al azar. Siempre que sea posible, la megafauna (por ejemplo, las holoturias) debe recogerse utilizando un ROV durante las transecciones con ROV o mediante pesca de arrastre; se debe intentar recoger al menos diez animales de cada uno de los principales taxones de megafauna. Los estudios de marcaje con isótopos para cuantificar las actividades microbianas y de la fauna y los vínculos de la red alimentaria deben realizarse *in situ* utilizando plataformas de cámaras bentónicas (ROV o plataformas sobre el fondo) en un mínimo de diez sitios seleccionados al azar, y se deben repetir las mediciones con cámara bentónica en cada sitio (Sweetman *et al.*, 2019).

314. Los residuos de tamiz de la meiofauna y la macrofauna deben colocarse en una bolsa de plástico, congelarse en nitrógeno líquido y almacenarse a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Nunca deben utilizarse fijadores a base de alcohol cuando se fijen muestras para estudiar los isótopos estables. La megafauna recogida mediante ROV o redes de arrastre debe trasladarse inmediatamente a una cámara frigorífica; hasta diez individuos de cada taxón deben sellarse individualmente en bolsas de plástico, congelarse en nitrógeno líquido y almacenarse a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

315. La meiofauna y la macrofauna deben clasificarse cuando se esté en el laboratorio, teniendo cuidado de calentar las muestras lo menos posible. Para eliminar los restos orgánicos adheridos, debe lavarse la fauna con agua de mar filtrada y fría; a continuación, se colocará en recipientes para análisis de isótopos de estaño o plata (si es fauna calcárea) previamente pesados. Los tejidos objetivo de la megafauna (por ejemplo, la pared corporal, los músculos, los brazos de los ofiuroides) deben extraerse en el laboratorio, con cuidado de calentar el tejido lo menos posible, y colocarse en papel de aluminio. Todas las muestras deben secarse durante dos o tres días a  $45\text{ }^{\circ}\text{C}$  y los tejidos de la megafauna deben triturarse a mano con un mortero. Los tejidos de la megafauna calcárea deben colocarse en recipientes de plata para el análisis de isótopos. Los animales y tejidos calcáreos (por ejemplo, los brazos de los ofiuroides) deben acidificarse a continuación con HCl al 10 % para eliminar los carbonatos y secarse de nuevo a  $45\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante tres días, lo cual irá seguido de un paso adicional de acidificación si no se han eliminado todos los carbonatos. A continuación, las muestras isotópicas deben prepararse para el análisis de isótopos (según lo especificado por el laboratorio que analice las muestras) y enviarse para ser analizadas como se describe en la bibliografía (por ejemplo, Hardy *et al.*, 2008; Levin *et al.*, 2009; Sweetman *et al.*, 2013).

316. A fin de cuantificar los tipos de alimentos predominantes de la fauna, se deben preparar muestras de materia orgánica particulada recogidas en trampas de sedimentos y muestras de sedimentos (véase la sección V.H) para analizar los isótopos

estables; sus firmas isotópicas deben corregirse si las muestras se han conservado en una solución de formaldehído.

317. Los estudios de marcaje con isótopos para documentar las actividades y los vínculos de la red alimentaria deben realizarse *in situ* utilizando cámaras bentónicas manipuladas mediante ROV o plataformas con cámaras bentónicas. Para documentar la actividad metabólica heterótrofa de los microorganismos y la fauna, deben utilizarse cultivos de fitoplancton marcados con  $^{13}\text{C}$  en los estudios de marcaje (Sweetman *et al.*, 2019), mientras que la actividad microbiana autótrofa puede determinarse utilizando como marcador bicarbonato marcado con  $^{13}\text{C}$ . Además, los estudios de marcaje en los que se utiliza bicarbonato marcado con  $^{13}\text{C}$  o glucosa marcada con  $^{13}\text{C}$  permiten detectar más vínculos en la red alimentaria; por ejemplo, se puede determinar qué animales se alimentan de microorganismos (Sweetman *et al.*, 2019). Los estudios de marcaje *in situ* deben seguir los métodos de Stratmann *et al.* (2018) o Sweetman *et al.* (2019) y ejecutarse durante un período de 36 a 48 horas. La transformación del carbono orgánico (procedente de fitoplancton marcado con  $^{13}\text{C}$ ) en  $\text{CO}_2$  puede cuantificarse en estos experimentos si las cámaras que se utilizan tienen capacidad de muestreo con jeringa. Si es así, las muestras deben recogerse en momentos determinados (por ejemplo, cada 6 u 8 horas) durante el experimento utilizando el muestreador con jeringa. En el laboratorio, las muestras deben filtrarse (con un filtro de acetato de celulosa de  $0,45\ \mu\text{m}$ ) y fijarse en viales Exetainer con 5-10  $\mu\text{l}$  de cloruro de mercurio al 6 % para analizar el carbono inorgánico total disuelto y la espectrometría de masas de proporciones isotópicas en relación con el  $^{13}\text{C}$  (Sweetman *et al.*, 2010). Siempre se deben anotar la profundidad del agua en la cámara y la superficie de la cámara para determinar el volumen de agua en la cámara al final de cada experimento. Al final del experimento, se debe utilizar un sacatestigos de empuje o de hojas para muestrear los sedimentos a fin de estudiar los microorganismos y la fauna en el caso de las cámaras manipuladas mediante ROV, mientras que las plataformas con cámaras bentónicas, en su mayor parte, recogen automáticamente los sedimentos que se han visto expuestos al sustrato marcado. Una vez a bordo, los sedimentos se trasladarán a una cámara frigorífica y se tomarán muestras para analizar los microorganismos a las profundidades de 0-1 cm, 1-5 cm y 5-10 cm, se homogeneizarán y se congelarán en botellas de vidrio (previamente lavadas con metanol y diclorometano en proporción 1:1 y secadas) utilizando nitrógeno líquido, y se pondrán a  $-20\ ^\circ\text{C}$ . Se tomarán muestras por separado en los mismos horizontes de profundidad para analizar el contenido de humedad de los sedimentos. La meiofauna debe muestrearse con un sacatestigos de empuje (cámaras manipuladas mediante ROV) o con un sacatestigos de jeringa (plataforma con cámara bentónica) a profundidades de 0-1 cm y 1-2 cm; a continuación, se tamizará con una malla de  $32\ \mu\text{m}$  y se transferirá a una solución tamponada de agua de mar y formaldehído al 4 % (es decir, formol al 10 %). La macrofauna debe muestrearse a partir de los sacatestigos de hojas (cámaras manipuladas mediante ROV) o del resto de la cámara en el caso de una muestra tomada mediante una plataforma con cámara bentónica, tamizarse con una malla de  $300\ \mu\text{m}$  y conservarse en formol. Las muestras para las firmas isotópicas microbianas y animales de referencia deben recogerse utilizando sacatestigos de empuje manipulados mediante ROV, sacatestigos de caja o sacatestigos de gran tamaño, y prepararse y conservarse de la misma manera. Aunque la conservación en formol puede afectar a las firmas de  $\delta^{13}\text{C}$  en 0,5-1 partes por mil, es probable que el marcaje de la fauna sea significativamente mayor (500-1.000 partes por mil), lo que anula la necesidad de congelar las muestras. Además, la conservación de las muestras de referencia en formol anula el efecto que tiene la conservación en formol sobre las firmas isotópicas cuando se calculan las tasas de alimentación de la fauna. En el laboratorio, se debe cuantificar la incorporación del marcador a los ácidos grasos microbianos y la biomasa de la fauna (es decir, la

actividad metabólica o de alimentación) utilizando los métodos descritos en Stratmann *et al.* (2018) y Sweetman *et al.* (2019).

318. Los datos sobre la abundancia natural de los isótopos obtenidos a partir de la fauna ( $\delta^{13}\text{C}$ ,  $\delta^{15}\text{N}$ ), las muestras de las trampas de sedimentos y los sedimentos deben generarse utilizando un espectrómetro de masas de proporciones isotópicas, disponible en instituciones académicas y laboratorios comerciales. Los datos derivados de las muestras conservadas en formol deben corregirse en función de la conservación en formol. Los valores corregidos sumados a las fuentes de la red alimentaria deben utilizarse para determinar las fuentes alimentarias basales que utiliza la fauna muestreada, empleando un modelo de mezcla de isótopos (por ejemplo, MixSIAR) (Harbour *et al.*, 2020), más el número de niveles tróficos presentes en la red alimentaria bentónica.

319. Los parámetros que deben registrarse para analizar los isótopos naturales son las listas de especies, las firmas de  $\delta^{13}\text{C}$  y  $\delta^{15}\text{N}$  y la biomasa (en términos de  $\mu\text{g}$  de C y N), junto con los métodos analíticos, el número de muestras y las estimaciones de error adecuadas.

320. Los parámetros que deben registrarse para los estudios de marcaje con isótopos son los siguientes: listas de especies, tasas de captación de carbono por parte de los microorganismos, la meiofauna y la macrofauna a partir de diversas fuentes orgánicas e inorgánicas (en  $\text{mmol C m}^{-2} \text{d}^{-1}$ ), identificación de la fauna clave que se alimenta de microorganismos y profundidad de la mezcla de la materia orgánica en los sedimentos a corto plazo si se recogen muestras de sedimentos para calcular el  $^{13}\text{C}$  orgánico total. Deben facilitarse las medias, junto con el número de muestras y las estimaciones de error adecuadas.

321. Además, deben registrarse las firmas isotópicas ( $\delta^{13}\text{C}$ ,  $\delta^{15}\text{N}$ ) en los tejidos de la fauna bentónica, la producción de carbono inorgánico disuelto marcado con  $^{13}\text{C}$ , las firmas de  $^{13}\text{C}$  de los ácidos grasos microbianos y la biomasa de la fauna y la distribución en profundidad de los detritos marcados con  $^{13}\text{C}$  a través de los sedimentos.

322. A partir de esas mediciones, debe determinarse lo siguiente: la cantidad de carbono incorporada a la biomasa de los microorganismos y la fauna del fondo marino por unidad de superficie y por unidad de tiempo (es decir, la actividad metabólica o de alimentación), el número de niveles tróficos presentes en la red alimentaria, las fuentes alimentarias dominantes que se consumen, la contribución de los distintos alimentos a la dieta de los diferentes tipos de fauna, la estructura trófica de la meiofauna y la macrofauna, las tasas de reciclaje del carbono de los microbios y la fauna, las tasas de mezcla sedimentaria a corto plazo y las tasas de respiración.

## H. Variable medida: ecotoxicología

323. Para establecer el posible riesgo ecotoxicológico de la extracción de minerales, deben utilizarse múltiples fuentes de datos (o líneas de pruebas). Las fuentes de datos se pueden compartimentar en componentes discretos a fin de generar pruebas de peso suficiente para determinar el riesgo tóxico relativo de un recurso y una operación minera en particular (el planteamiento del peso de las pruebas) (Regoli *et al.*, 2019). La guía práctica sobre la valoración de la calidad de los sedimentos (Simpson y Batley, 2016) ofrece más detalles sobre las medidas pertinentes, pero se debe tener en cuenta que ninguna se ha probado todavía en las profundidades marinas.

324. El peso de las pruebas debe integrar los datos de las siguientes líneas de pruebas:

- a) Propiedades físicoquímicas de los sedimentos o los minerales;

- b) Bioensayos ecotoxicológicos de laboratorio;
- c) Bioacumulación de metales en especies indicadoras;
- d) Efectos subletales o biomarcadores en especies indicadoras;

325. Cada línea de pruebas debe analizarse utilizando los métodos cuantitativos más adecuados; cada una debe analizarse durante la recogida de datos de referencia.

326. La caracterización mineralógica del recurso y el sedimento para conocer la proporción relativa de especies de minerales y metales debe utilizarse para determinar el metal y las mezclas de metales que contribuirán al posible riesgo tóxico general para las especies biológicas.

327. Además, deberán recuperarse especímenes biológicos de especies dominantes claves de la biomasa o la red trófica (de un mínimo de tres grupos taxonómicos, pero véase la discusión en la parte R.10.3.2 de ECHA, 2008) de los compartimentos bentónicos y pelágicos (toda la profundidad del agua) en más de cuatro ocasiones y en al menos un ciclo estacional de 12 meses, a fin de determinar las concentraciones de referencia de los metales, otros contaminantes orgánicos y los niveles de biomarcadores bioquímicos y celulares en especies clave bentónicas, abisopelágicas y batipelágicas. Los biomarcadores son señales de alerta temprana de problemas de salud del ecosistema (Andersen, 1997; Simpson y Batley, 2016; Mestre *et al.*, 2017).

328. La activación de las rutas de desintoxicación antioxidantes debe evaluarse mediante estudios de biomarcadores establecidos (resumidos en Simpson y Batley, 2016). Entre esos estudios de biomarcadores se encuentran los de la actividad de la superóxido dismutasa tisular, llevados a cabo mediante la determinación espectrofotométrica de la reducción del citocromo c por el sistema xantina oxidasa/hipoxantina a 550 nm (por ejemplo, McCord y Fridovich, 1969). Otros análisis de rutas antioxidantes que podrían llevarse a cabo son la cuantificación de la concentración de metalotioneínas (un tipo de proteínas) mediante polarografía de pulso diferencial (por ejemplo, Bebianno y Langstone, 1989; Mourgaud *et al.*, 2002) y estudios enzimáticos de las actividades de la catalasa, la glutatión peroxidasa y la glutatión S-transferasa (Auguste *et al.*, 2016).

329. A continuación, debe establecerse la ecotoxicidad relativa de diversas fases minerales o sedimentarias generales (por ejemplo, la particulada y la acuosa) para los organismos biológicos, utilizando especies biológicas representativas en experimentos de laboratorio controlados y normalizados. La toxicidad general de un recurso puede establecerse sin conocer *a priori* la composición mineral precisa. Utilizando protocolos de laboratorio establecidos, se puede evaluar la toxicidad relativa de las fases del recurso en general (en relación con referencias conocidas de minerales puros que se espera que estén presentes en ese recurso en particular). Utilizando protocolos de laboratorio establecidos, se debe cuantificar la toxicidad relativa de diversas fases del recurso en general (en relación con referencias conocidas de minerales puros, como el  $\text{CuFeS}_2$ ). Deben realizarse experimentos en fase acuosa (por ejemplo, minerales metálicos lixiviados de una superficie mineral recién expuesta) y experimentos en fase sólida para imitar la operación minera prevista, replicando el tamaño de los fragmentos o partículas y la duración y la temperatura de la lixiviación (por ejemplo, Brown y Hauton, 2018; Knight *et al.*, 2018). Para establecer la ecotoxicidad de un recurso en general, deben consultarse y utilizarse las indicaciones de Simpson y Batley (2016) y protocolos normalizados reconocidos internacionalmente (por ejemplo, ECHA 2008, ECHA 2016).

330. La posible toxicidad de los penachos de descarga de sedimentos procedentes de los procesos de deshidratación para especies biológicas representativas a la profundidad de descarga prevista debe evaluarse sobre la base del plan del operador

para la recuperación, la transferencia del elevador a la superficie, la deshidratación y el transporte. Las especies biológicas modelo pueden abarcar cultivos de cianobacterias (por ejemplo, *Prochlorococcus*, *Synechococcus* o *Cyanobium*) en la zona epipelágica, zooplancton (por ejemplo, copépodos calanoideos o ciclopoideos) o cnidarios (o zooplancton gelatinoso similar) (por ejemplo, *Aurelia* o *Nematostella*) para estudiar los penachos de descarga en la zona mesopelágica y batipelágica, así como peces (por ejemplo, *Oryzias melastigma*) (Bo *et al.*, 2011; Kong *et al.*, 2008).

331. Deberá determinarse la concentración letal (CL<sub>50</sub>) o la toxicidad de la dosis letal (DL<sub>50</sub>) de los posibles penachos de descarga de sedimentos procedentes de los procesos de deshidratación para especies pertinentes representativas de la macrofauna, junto con los efectos tóxicos crónicos o subletales de la exposición a las fases sólidas o acuosas del mineral en general o del penacho de deshidratación, y la actividad de los biomarcadores más importantes.

## **I. Variable medida: mamíferos marinos, tiburones, tortugas y necton de superficie**

332. Para recopilar información sobre los mamíferos marinos, los tiburones, las tortugas y el necton de superficie, se debe utilizar una combinación de transecciones lineales visuales realizadas desde el barco siguiendo los métodos normalizados descritos en Buckland *et al.* (2001), Barlow y Forney (2007), Verfuss *et al.* (2018) y en el sitio web del proyecto SCANS II. Se deben llevar a cabo en cada estación durante las horas en que haya luz diurna y con el barco moviéndose a una velocidad constante de 9 a 10 nudos a lo largo y ancho de una cuadrícula; todo ello se complementará con el uso de hidrófonos remolcados para detectar las vocalizaciones de los mamíferos marinos. La información recopilada de este modo debe complementarse con los datos de las estaciones de vigilancia acústica pasiva desplegadas sobre amarres oceanográficos para vigilar continuamente las vocalizaciones de los mamíferos marinos durante varios ciclos anuales completos.

333. Los parámetros que deben registrarse son el tamaño del grupo, las especies encontradas (en el caso de los mamíferos marinos quizás sea posible identificar a individuos concretos) y la abundancia de esas especies. Siempre que sea posible, se deben tomar fotografías.

## **J. Variable medida: aves marinas**

334. Para conocer a fondo la distribución y abundancia de las aves marinas y el impacto de cualquier actividad humana sobre ellas en el mar, se debe recabar información de varias fuentes. Se debe hacer un seguimiento de la atracción de las aves marinas hacia las infraestructuras y los buques (tanto en tránsito como fijos) y de las colisiones de las aves marinas con las infraestructuras y los buques; se deben hacer censos sistemáticos de las aves marinas; se deben recopilar y analizar los datos de seguimiento de las aves marinas recogidos anteriormente, incluidas las capas cartográficas de SIG de fácil acceso, como las zonas marinas de importancia para las aves y la biodiversidad y las zonas clave para la biodiversidad; y se deben analizar los programas de vigilancia de las zonas de cría pertinentes (por ejemplo, el número de crías, los parámetros demográficos o el éxito de la cría). Además, en la medida de lo posible, se debe hacer un seguimiento de las especies y las poblaciones pertinentes.

335. La abundancia y la atracción de las aves marinas deben estudiarse desde plataformas fijas o desde barcos utilizando prospecciones visuales, imágenes o radares. Las prospecciones visuales desde barcos fijos deben realizarse mediante recuentos instantáneos de aves, también denominados “recuentos puntuales”, dentro

de un semicírculo (normalmente hasta una distancia de 300 a 500 m) durante un período de 10 a 15 minutos a intervalos regulares (por ejemplo, 20-60 minutos) (Gjerdrum *et al.*, 2012); Bolduc y Fifield, 2017). Los radares marinos deben utilizarse para estimar la abundancia de aves marinas y el riesgo de colisión (Gauthreaux y Belser, 2003; Desholm y Kahlert, 2005; Bertram *et al.*, 2015; Assali *et al.*, 2017). Además, la abundancia y la atracción de las aves marinas debe evaluarse mediante un censo de las aves marinas utilizando transecciones lineales desde barcos o aviones (Camphuysen *et al.*, 2004; Ronconi y Burger, 2009; Gjerdrum *et al.*, 2012).

336. Siempre que sea posible, los cadáveres de las aves marinas muertas por colisión deben recogerse haciendo búsquedas sistemáticas, conservarse congelados en una infraestructura permanente para futuras referencias con respecto a los contaminantes emergentes y analizarse para buscar contaminantes en diversos tejidos (Gochfeld, 1973; Barbieri *et al.*, 2010; Amélineau *et al.*, 2016). El objetivo es crear una base de referencia con la que comparar el contenido de los tejidos de los cadáveres recogidos durante las operaciones. Debe analizarse una gran variedad de contaminantes, en particular los que pueden liberarse durante las actividades mineras.

337. Deben solicitarse y utilizarse conjuntos de datos pertinentes a fin de evaluar la importancia de una zona específica para las aves marinas (entre otros depredadores marinos). Existen datos de seguimiento en el mar de muchos depredadores marinos importantes. En la actualidad hay varias iniciativas mundiales en las que se recopila y analiza periódicamente información sobre las especies marinas migratorias con el fin de identificar zonas importantes en el mar, incluidas las zonas importantes para las aves y la biodiversidad (<https://maps.birdlife.org/marineibas>) y las zonas clave para la biodiversidad ([www.keybiodiversityareas.org](http://www.keybiodiversityareas.org)). Entre estas iniciativas se encuentran las siguientes: Seabird Tracking Database ([www.seabirdtracking.org/](http://www.seabirdtracking.org/)), Migratory Connectivity in the Ocean (<https://mico.eco>) y Movebank for Animal Tracking Data ([www.movebank.org/cms/movebank-main](http://www.movebank.org/cms/movebank-main)).

338. Gracias a los datos de seguimiento, se puede determinar el origen de las aves marinas que se encuentran en una zona concreta y, por tanto, se puede conocer y vigilar su población de origen. Los datos de seguimiento también permiten obtener estimaciones precisas del tamaño de la población e identificar las especies que visitan una zona concreta (algunas de ellas, difíciles de identificar en el mar desde un barco o una plataforma), así como conocer el estado reproductivo, la variación estacional, las poblaciones específicas que visitan la zona e incluso la distribución por edad y sexo de los animales visitantes. La información debe utilizarse para identificar las colonias de cría originales. Los programas de vigilancia llevados a cabo en esas colonias de cría proporcionan datos de referencia adicionales que deben ser examinados.

339. Los parámetros deben registrarse a lo largo del año, como se indica a continuación:

a) A partir de prospecciones visuales, censos, recuentos por imagen o por radar: abundancias relativas y absolutas de aves marinas identificadas al nivel taxonómico más bajo posible, normalmente a nivel de especie, y, siempre que sea posible, por sexo, edad y variaciones estacionales y de plumaje; índices de diversidad; y el uso que hacen de la zona y la ruta de navegación a lo largo del tiempo;

b) A partir de los datos de seguimiento: la proporción estimada de aves de cada colonia en una zona definida y a lo largo de una ruta marítima definida que utiliza esa zona o ruta marítima a lo largo del tiempo, identificadas por especie, población, colonia de cría, estado reproductivo, sexo y edad;

c) A partir de los programas de vigilancia: tamaño de la población, éxito reproductivo, supervivencia de jóvenes, inmaduros y adultos, edad de reclutamiento,

tendencias de la población y estimaciones de la viabilidad de la población y del tiempo hasta la extinción;

d) A partir de las colisiones y los cadáveres recogidos: número de muertes por día a lo largo del tiempo, desglosado por especie, sexo, madurez sexual, muda y estado físico. Deben recogerse tejidos del hígado, el músculo, la grasa y las plumas, y se debe determinar la concentración de contaminantes (lista del Convenio de Estocolmo) en esos tejidos; se debe analizar el contenido estomacal y determinar la cantidad de microplásticos y microfibras en el estómago.

## K. Calidad de los datos

340. Para el muestreo temporal, siempre que sea posible, se debe volver a visitar la misma zona general que en los estudios anteriores. Las muestras para el análisis temporal deben ser de tamaño suficiente para una determinación fiable de los parámetros de interés. Para mejorar la comparabilidad, el tamaño de la muestra debe mantenerse constante entre los distintos estudios.

341. Los conjuntos de datos recogidos o analizados por diferentes investigadores deben estar normalizados para que sean comparables. Ello es especialmente importante en las investigaciones de series cronológicas o en aquellas en las que hay múltiples operadores. Cuando se detectan incoherencias, es necesario un mayor control de la calidad.

342. Se pueden hacer comparaciones entre estudios de megafauna aunque los métodos de obtención no sean idénticos. Sin embargo, una comparación sólida se basa en tener imágenes cuantificadas con precisión (a escala) y la mayor coherencia posible en la calidad de las imágenes (con respecto a la resolución, la iluminación, el balance de color y otros factores). Para cualquier comparación posterior, debe evaluarse cuidadosamente la posibilidad de sesgo metodológico entre los estudios; por ejemplo, deben evaluarse los patrones de control de los taxones clave para asegurarse de que son claramente distintos en los diferentes conjuntos de datos. Hay que suponer que existe un sesgo metodológico hasta que se demuestre lo contrario.

343. Para que la calidad de las imágenes sea la adecuada, la iluminación debe ser suficiente para mantener una cobertura casi uniforme de toda la imagen del fondo marino a la altitud objetivo; los ajustes del generador de imágenes, como los aumentos y la exposición, deben mantenerse constantes durante todo el estudio y la cámara no debe moverse con respecto a la plataforma de la cámara en ninguna transección (por ejemplo, utilizando una unidad de giro e inclinación montada en un ROV).

344. La escala de todas las imágenes debe ajustarse con precisión utilizando un método fotogramétrico, que requiere información precisa sobre la altitud, el alabeo y el cabeceo de la imagen. Los datos del altímetro deben tener una precisión de  $\pm 10$  mm. Se deben obtener imágenes de prueba de escala conocida en el fondo marino para verificar los cálculos. El uso de láseres proyectados sobre el fondo marino es un método alternativo.

345. Muchos organismos solo pueden identificarse hasta el nivel de especie examinando características no visibles en las fotografías (por ejemplo, características ocultas, internas o microscópicas). Los métodos moleculares y de otro tipo (por ejemplo, la genómica, la transcriptómica o la genética de poblaciones) requieren material de muestra. Por tanto, deben obtenerse muestras precisas de especímenes individuales que estén vinculadas a imágenes *in situ*, imágenes *ex situ*, muestras de tejido y una muestra para el análisis morfológico del mismo individuo. La mejor manera de obtener esas muestras es mediante un vehículo teledirigido o tripulado por personas. Se trata de algo especialmente importante en el caso de muchos taxones,

sobre todo los de cuerpo blando (por ejemplo, las anémonas), que tienen un aspecto muy diferente cuando están vivos en el fondo marino que cuando están en la superficie, después de la recuperación.

346. Todas las identificaciones deben hacerse al nivel taxonómico más bajo posible. Además, deben facilitarse las claves taxonómicas y las referencias utilizadas para hacer las determinaciones, con el fin de garantizar la equivalencia entre los elementos de identificación.

347. La identificación molecular mediante código de barras (secuencias de Sanger) y la obtención de metacódigos de barras (variantes de secuencias de amplicones) debe proporcionar una lista de especies o géneros que se elabora cotejando los datos genéticos obtenidos con los disponibles en las bases de datos públicas de referencia, como GenBank ([www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank)). Para ello, se puede utilizar la herramienta de búsqueda de alineación local básica (Blast) o el clasificador de la base de datos ribosómicos denominada Ribosomal Database Project.

348. Para evaluar la biomasa, el método adecuado consiste en utilizar un modelo del ciclo del material ecológico; en este sentido, la clasificación en función del tamaño es mejor que la clasificación en función de la taxonomía.

349. Cuando se necesitan muestras más grandes que las que se pueden recoger con métodos precisos, puede resultar apropiado el muestreo con redes de arrastre o con trineos epibentónicos. Se debe tener cuidado, ya que estas técnicas pueden perturbar zonas relativamente grandes del fondo marino; su uso puede requerir una Evaluación del Impacto Ambiental (véase [ISBA/25/LTC/6/Rev.1](#) junto con [ISBA/25/LTC/6/Rev.1/Corr.1](#)) y puede afectar a otras labores de muestreo.

350. Para determinar si se ha recogido un número suficiente de individuos para caracterizar las comunidades, debe elaborarse una curva de recogida, también denominada análisis de Chao. Es probable que ello sea necesario, dado el bajo número de individuos y la alta diversidad.

351. Para garantizar la solidez estadística, se debe muestrear un número suficiente de réplicas. El número de muestras repetidas depende de la densidad o la riqueza del taxón de interés y de su variación. Para demostrar la solidez estadística, se debe notificar la potencia determinada de un análisis de la varianza combinado con un diseño de tipo antes/después-control/impacto, sobre la base de los datos reales proporcionados por la base de referencia. El análisis de la potencia debe presentarse teniendo en cuenta la escala  $d$  de Cohen del tamaño del efecto ( $d$  bajo=0,2,  $d$  medio=0,5,  $d$  alto=0,8) (Cohen, 1988). Se debe proporcionar el número de muestras repetidas necesarias para alcanzar una potencia del 95 % (Ardron *et al.*, 2019).

352. El número de nódulos necesarios para estudiar la asociación de la fauna depende de la abundancia del nódulo en la zona de estudio y del número de nódulos realmente recogidos con un sacatestigos de caja o un muestreador. Para estudiar la biodiversidad bentónica, deben recogerse al azar un mínimo de 25 nódulos, aproximadamente. Para una mejor cobertura espacial de las muestras, se deben recoger muestras de al menos tres testigos de caja por zona fisiográfica durante el estudio de generación de datos de referencia y seguimiento.

353. Cuando el diseño del muestreo esté desequilibrado, los índices de diversidad se deben rarificar al número de repeticiones más bajo.

354. El número de aves marinas es específico de cada lugar concreto; no será posible establecer el origen, el estado reproductivo, la edad ni el sexo de las aves marinas observadas. La identificación de aves marinas en el mar no es una tarea fácil y deben llevarla a cabo ornitólogos experimentados utilizando una de las guías mundiales de identificación de aves marinas (como Harrison, 2000; Howell y Zuflet, 2019). La

mayoría de los datos de seguimiento de aves marinas están sesgados o se limitan a ciertas especies (algunas pequeñas, pero la mayoría de tamaño medio y grande), a ciertos períodos del ciclo anual y a ciertas etapas de la vida (normalmente adultos reproductores).

## L. Gestión de los datos

355. Deben generarse metadatos para todos los especímenes recogidos, incluidos los datos de profundidad, latitud, longitud y sustrato en el que se encuentran (por ejemplo, nódulo, endofauna, asociación con otros organismos). A partir de los metadatos, deben crearse catálogos de especies utilizando el sistema Darwin Core.

356. Los ejemplares de referencia de todos los especímenes deben depositarse en museos o en colecciones nacionales para ponerlos a disposición de la comunidad científica. Para ello, se debe emplear un método de almacenamiento apropiado para el análisis (por ejemplo, formol o etanol para la identificación morfológica, etanol o congelación para el análisis molecular). Algunos métodos de análisis (por ejemplo, la ecotoxicología) no permiten almacenar la muestra en su totalidad; en estos casos, deben tomarse varias muestras de tejido (al menos músculo, plumas, grasa intestinal e hígado) y almacenarse individualmente.

357. El ADN extraído debe conservarse en las cámaras frigoríficas de los museos. Las secuencias genéticas deben depositarse en repositorios gratuitos como GenBank ([www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank)) o Barcode of Life Data System ([www.boldsystems.org](http://www.boldsystems.org)). Los genotipos deben depositarse en repositorios gratuitos como Dryad (<https://datadryad.org/stash>) o Pangaea ([www.pangaea.de](http://www.pangaea.de)). Los datos de RADseq deben depositarse en repositorios gratuitos como la base de datos Sequence Read Archive del Centro Nacional de Información Biotecnológica ([www.ncbi.nlm.nih.gov/sra](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sra)). Los datos de las secuencias de Sanger y de la secuenciación de alto rendimiento deben archivarse en bases de datos de acceso público junto con todos los metadatos pertinentes, en particular la información de georreferenciación. Para los datos de Sanger debe utilizarse GenBank y para los datos de secuenciación de alto rendimiento, Sequence Read Archive; se debe tener en cuenta que los datos de secuenciación de alto rendimiento deben cargarse demultiplexados, es decir, con dos archivos de lectura por muestra.

358. Siempre que sea posible, las identificaciones deben documentarse mediante pruebas fotográficas, en caso de que sea necesario revisar la información.

359. Lo ideal es almacenar las imágenes tal como las obtuvo la cámara (en formato de archivo RAW) y tal como se procesaron para su análisis (en otro formato de archivo). Tanto los archivos de imágenes sin procesar como los procesados deben estar vinculados a los metadatos del estudio mediante la asignación de un nombre de imagen único, de modo que los conjuntos de datos puedan combinarse con facilidad.

360. Los datos sin procesar y la información sobre el lugar y el método de almacenamiento de los especímenes deben presentarse a la Autoridad como parte de los informes anuales y como metadatos en los envíos de datos del contratista a la base de datos DeepData de la Autoridad.

## VIII. Bibliografía

Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos. Method 180.1: Determination of Turbidity by Nephelometry. Edited by James W. O'Dell. Revisión 2.0. Agosto de 1993. Se encuentra en línea en: [https://www.epa.gov/sites/default/files/2015-08/documents/method\\_180-1\\_1993.pdf](https://www.epa.gov/sites/default/files/2015-08/documents/method_180-1_1993.pdf).

- Allen, JT, Fuda, J-L, Perivoliotis, L, Munoz-Mas, C, Alou, E, Reeve, K (2018) Guidelines for the delayed mode scientific correction of glider data. WP 5, Task 5.7, D5.15. Versión 4.1. Palma de Mallorca (España), SOCIB – Sistema de Observación Costero y de Predicción de las Islas Baleares para JERICO-NEXT, 20 págs. (JERICO-NEXT-WP5-D5.15-140818-V4.1) <http://dx.doi.org/10.25607/OBP-430>.
- Allen, JT, Munoz, C, Gardiner, J, Reeve, KA, Alou-Font, E, Zarokanellos, N (2020) Near-Automatic Routine Field Calibration/Correction of Glider Salinity Data Using Whitespace Maximization Image Analysis of Theta/S Data. *Frontiers in Marine Science*, 7:398,14 págs. <https://doi.org/10.3389/fmars.2020.00398>.
- Alve, E, Korsun, S, Schönfeld, J, Dijkstra, N, Golikova, E, Hess, S, Husum, K, Panieri, G (2016) Foram-AMBI: a sensitivity index based on benthic foraminiferal faunas from North-East Atlantic and Arctic fjords, continental shelves and slopes. *Mar. Micropaleontol.* 122, 1–12.
- Amélineau F, Bonnet D, Heitz O, Mortreux V, Harding AMA, Karnovsky N, Walkusz W, Fort J, Grémillet D (2016) Microplastic pollution in the Greenland Sea: Background levels and selective contamination of planktivorous diving seabirds. *ENVIRON POLLUT* 219:1131-1139.
- Andersen, NR (1997) An early warning system for the health of the oceans. *Oceanography* 10.1 (1997): 14-23. <https://doi.org/10.5670/oceanog.1997.39>.
- Andrews KR, Good JM, Miller MR, Luikart G, Hohenlohe, PA (2016) Harnessing the power of RADseq for ecological and evolutionary genomics. *Nature Reviews Genetics*, 17, 81–92.
- Ardron JA, Simon-Lledó E, Jones DO, Ruhl HÁ (2019). Detecting the Effects of Deep-Seabed Nodule Mining: Simulations Using Megafaunal Data from the Clarion-Clipperton Zone. *Frontiers in Marine Science*, 6:604.
- Assali C, Bez N, Tremblay Y (2017) Seabird distribution patterns observed with fishing vessel's radar reveal previously undescribed sub-meso-scale clusters. *Scientific Reports* 7:1423.
- Auguste, M, Mestre, NC, Rocha, TL, Cardoso, C, Cuffe-Gauchard, V, Le Bloa, S, Cambon-Bonavita, MA, Shillito, B, Zbinden, M, Ravaux, J, Bebianno, MJ (2016) Development of an ecotoxicological protocol for the deep-sea fauna using the hydrothermal vent shrimp *Rimicaris exoculata*. *Aquatic Toxicology* 175: 277–285. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2016.03.024>.
- Barbieri E, Passos EDA, Filippini A, Dos Santos IS, Garcia CAB (2010) Assessment of trace metal concentration in feathers of seabird (*Larus dominicanus*) sampled in the Florianópolis, SC, Brazilian coast. *ENVIRON MONIT ASSESS* 169:631-638.
- Barlow, J, Forney, KA (2007) Abundance and population density of cetaceans in the California Current ecosystem. *Fishery Bulletin*, 105, 509–526.
- Basu, S, Jones, A, Mahzari, P (2020) Best Practices for Shale Core Handling: Transportation, Sampling and Storage for Conduction of Analyses. *Journal of Marine Science and Engineering*, 8(2):136. <https://doi.org/10.3390/jmse8020136>.
- Becker, S., Aoyama, M., Woodward, E.M.S., Bakker, K., Coverly, S., Mahaffey, C., Tanhua, T. (2019) GO-SHIP Repeat Hydrography Nutrient Manual: The precise and accurate determination of dissolved inorganic nutrients in seawater, using Continuous Flow Analysis methods. In: GO-SHIP Repeat Hydrography Manual: A Collection of Expert Reports and Guidelines. Versión 1.1, 56 págs. <http://dx.doi.org/10.25607/OBP-555>.

- Bebianno, MJ, Langston, WJ (1989) Quantification of metallothioneins in marine invertebrates using differential pulse polarography. *Portugaliae Electrochimica Acta* 7: 511–524.
- Beerli, P, Palczewski, M (2010) Unified framework to evaluate panmixia and migration direction among multiple sampling locations. *Genetics*, 185(1), 313-326.
- Benoit-Bird, KJ, Moline, MA, Southall, BL (2017) Prey in oceanic sound scattering layers organize to get a little help from their friends. *Limnol. Oceanogr.* 62, 2017, 2788–2798.
- Bernstein, BB, Hessler, RR, Smith, R, Jumars, PA (1978) Spatial dispersion of benthic Foraminifera in the abyssal central North Pacific, *Limnology and Oceanography* 23: 401-416.
- Bertram, DF, Drever, MC, McAllister, MK, Schroeder, BK, Lindsay, DJ, Faust, DA (2015) Estimation of coast-wide population trends of Marbled Murrelets in Canada using a Bayesian hierarchical model. *PloS one*, 10(8), e0134891.
- Bhadury, P, Austen, MC, Bilton, DT, Lamshead, PJD, Rogers, AD, Smerdon, GR (2006) Development and evaluation of a DNA-barcoding approach for the rapid identification of nematodes. *Marine Ecology Progress Series* 320: 1-9.
- Biber, A, Korakci, A, Golick, A, Robinson, S, Hayman, G, Ablitt, J, Barrera-Figueroa, S, Buogo, S, Mauro, S, Borsani, J, Curcuruto, S, Linné, M, Sigray, P, Davidsson, P (2018) Calibration standards for hydrophones and autonomous underwater noise recorders for frequencies below 1 kHz: current activities of EMPIR “UNAC-LOW” project. *ACTA IMEKO*. 7. 32. [http://dx.doi.org/10.21014/acta\\_imeko.v7i2.542](http://dx.doi.org/10.21014/acta_imeko.v7i2.542).
- Bishop, JKB, Lam, PJ, Wood, TJ (2012), Getting good particles: Accurate sampling of particles by large volume *in-situ* filtration, *Limnol. Oceanogr. Methods*, 10, <https://doi.org/10.4319/lom.2012.10.681>.
- Bittig, HC, Körtzinger, A, Neill, C, van Ooijen, E, Plant, JN, Hahn, J (2018): Oxygen Optode Sensors: Principle, Characterization, Calibration, and Application in the Ocean. In: *Frontiers in Marine Science* 4, S. 429. <https://doi.org/10.3389/fmars.2017.00429>.
- Bo, J, Cai, L, Xu, JH, Wang, KJ, Au, DWT (2011) The marine medaka *Oryzias melastigma* - A potential marine fish model for innate immune study. *Marine Pollution Bulletin* 63: 267–276. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2011.05.014>.
- Boetius, A, Wenzhöfer, F (2013) Seafloor oxygen consumption fuelled by methane from cold seeps. *Nature Geosciences* 6: 725-734, <https://doi.org/10.1038/ngeo1926>.
- Bolduc, F, Fifield, DA (2017). Seabirds at-sea surveys: The line-transect method outperforms the point-transect alternative. *The Open Ornithology Journal*, 10(1).
- Boss, E, Guidi, L, Richardson, MJ, Stemmann, L, Gardner, W, Bishop, JKB, Anderson, RF, Sherrell, RM (2015) Optical techniques for remote and *in-situ* characterization of particles pertinent to GEOTRACES, *Progress in Oceanography*, volumen 133, abril de 2015, 43-54, <http://dx.doi.org/10.1016/j.pocean.2014.09.007>.
- Boxhammer, T, Taucher J, Bach LT, Achterberg EP, Algueró-Muñiz M, Bellworthy J, *et al.* (2018) Enhanced transfer of organic matter to higher trophic levels caused by ocean acidification and its implications for export production: A mass balance approach. *PloS ONE* 13(5): e0197502.
- Breitwieser, FP, Lu, J, Salzberg, SL (2017) A review of methods and databases for metagenomic classification and assembly. *Briefings in Bioinformatics*, 20(4) 1-15. <https://doi.org/10.1093/bib/bbx120>.

Brown, A, Hauton, C (2018) Ecotoxicological responses to chalcopyrite exposure in a proxy for deep-sea hydrothermal vent shrimp: Implications for seafloor massive sulphide mining. *Chemistry and Ecology* 34: 391-396. <https://doi.org/10.1080/02757540.2018.1427231>.

Buckland, ST, Anderson, DR, Burnham, KP, Laake, JL, Borchers, DL, Thomas, L (2001) *Introduction to distance sampling: Estimating abundance of biological populations*. Oxford (Reino Unido): Oxford University Press.

Bushnell, M, Waldmann, C, Seitz, S, Buckley, E, Tamburri, M, Hermes, J, Henslop, E, Lara-Lopez, A, (2019) *Quality Assurance of Oceanographic Observations: Standards and Guidance Adopted by an International Partnership*. *Front. Mar. Sci.* 19. <https://doi.org/10.3389/fmars.2019.00706>.

Camphuysen CJ, Fox AD, Leopold MF, Petersen IK (2004) *Towards standardized seabirds at-sea census techniques in connection with environmental impact assessments for offshore wind farms in the U.K: A comparison of ship and aerial sampling methods for marine birds and their applicability to offshore wind farm assessments*. Texel 2004; 37 págs.

Carey WM, Evans RB (2011) *Ocean Ambient Noise: Measurement and Theory*. The Underwater Acoustics Series. Springer Nueva York, 266 págs.

Christodoulou M, O'hara T, Hugall AF, Khodami S, Rodrigues CF, Hilario A, Vink A, Martinez Arbizu P (2020). Unexpected high abyssal ophiuroid diversity in polymetallic nodule fields of the northeast Pacific Ocean and implications for conservation. *Biogeosciences* 17, 1845-1876. <https://doi.org/10.5194/bg-17-1845-2020>.

Cohen J (1988), *Statistical Power Analysis for the Behavioral Sciences* (2nd ed.), New Jersey: Lawrence Erlbaum Associates.

Comisión Europea (2011) EUR 24872 – Guide to best practices for ocean acidification research and data reporting. Riebesell U, Fabry VJ, Hansson L, Gattuso J-P (eds.), Oficina de Publicaciones de la Unión Europea, Luxemburgo, 260 págs., doi:10.2777/66906.

Comisión Oceanográfica Intergubernamental (COI) (1992) *Guide to satellite remote sensing of the marine environment*. París (Francia), UNESCO, 178 págs. (Intergovernmental Oceanographic Commission Manuals and Guides; 24). <http://hdl.handle.net/11329/98>.

Cook, AB, Sutton TT, Galbraith JK, Vecchione, M (2013) Deep-pelagic (0–3000m) fish assemblage structure over the Mid-Atlantic Ridge in the area of the Charlie-Gibbs Fracture Zone. *Deep Sea Research Part II*, 98B: 279-291, <https://doi.org/10.1016/j.dsr2.2012.09.003>.

Coppola, L, Ntoumas, M, Bozzano, R, Bensi, M, Hartman, SE, Charcos Llorens, Mi, Craig, J, Rolin, J-F, Giovanetti, G, Cano, D, Karstensen, J, Cianca, A, Toma, D, Stasch, C, Pensieri, S, Cardin, V, Tengberg, A, Petihakis, G, Cristini, L (2016) *Handbook of best practices for open ocean fixed observatories*. European Commission, FixO3 Project, 127 págs. (European Commission, FixO3 project, FP7 Programme 2007-2013 under grant agreement nº 312463). <http://hdl.handle.net/11329/302>.

Cox, MJ, Letessier TB, Brierley AS (2013) Zooplankton and micronekton biovolume at the Mid-Atlantic Ridge and Charlie–Gibbs Fracture Zone estimated by multi-frequency acoustic survey, *Deep Sea Research Part II* , 98B: 269-278, <https://doi.org/10.1016/j.dsr2.2013.07.020>.

Danovaro R, Fanelli E, Aguzzi J, Billett D, Carugati L, Corinaldesi C, Dell'Anno A, Gjerde K, Jamieson AJ, Kark S, McClain C, Levin L, Levin N, Ramirez-Llodra E, Ruhl E, Smith CR, Snelgrove PVR, Thomsen L, Van Dover CL and Yasuhara M (2020) Ecological variables for developing a global deep-ocean monitoring and conservation strategy. *Nature Ecology & Evolution* 4, 181-192.

Davies AJ, Duineveld GCA, Lavaleye MSS, Bergman MJN, van Haren H, Roberts JM (2009). Downwelling and deep-water bottom currents as food supply mechanisms to the cold-water coral *Lophelia pertusa* (Scleractinia) at the Mingulay Reef complex. *Limnology and Oceanography* 54:620-629.

Desholm, M, Kahlert, J (2005). Avian collision risk at an offshore wind farm. *Biology letters*, 1(3), 296-298.

Dickson, AG, Sabine, CL, Christian, JR (eds) (2007) Guide to best practices for ocean CO<sub>2</sub> measurement. Sidney, British Columbia, Organización de Ciencias Marinas del Pacífico Norte, 191 págs. (PICES Special Publication 3; IOCCP Report 8).

Duran Munoz P, Sacau M, Garcia-Alegre A. Roman E (2020) Cold-water corals and deep-sea sponges by-catch mitigation: Dealing with groundfish survey data in the management of the northwest Atlantic Ocean high seas fisheries, *Marine Policy* 116. <https://doi.org/10.1016/j.marpol.2019.103712>.

ECHA (2008) Guidance on information requirements and chemical safety assessment Chapter R.10: Characterisation of dose [concentration]-response for environment. 65 págs. [https://echa.europa.eu/documents/10162/13632/information\\_requirements\\_r10\\_en.pdf](https://echa.europa.eu/documents/10162/13632/information_requirements_r10_en.pdf).

ECHA (2016) Guidance on information requirements and Chemical Safety Assessment Chapter R.16: Environmental exposure assessment. 178 págs. [http://echa.europa.eu/documents/10162/13632/information\\_requirements\\_r16\\_en.pdf](http://echa.europa.eu/documents/10162/13632/information_requirements_r16_en.pdf).

EGO Gliders Data Management Team (2020) EGO gliders NetCDF format reference manual NetCDF conventions Reference tables and files distribution. Versión 1.3. IFREMER, 67 págs. <https://doi.org/10.13155/34980>.

Erickson, ZK, Frankenberg, C, Thompson, DR, Thompson, AF, Gierach, M (2019). Remote sensing of chlorophyll fluorescence in the ocean using imaging spectrometry: Towards a vertical profile of fluorescence. *Geophysical Research Letters*. <https://doi.org/10.1029/2018GL081273>.

EuroGOOS DATA-MEQ Working Group (2010) Recommendations for *in-situ* data Near Real Time Quality Control [Versión 1.2]. EuroGOOS, 23 págs.

Firing, E, Hummon, JM (2010) Shipboard ADCP measurements – The GO-SHIP Repeat Hydrography Manual: A Collection of Expert Reports and Guidelines. IOCCP Report núm. 1, ICPO Publications Series núm. 134, Versión 1.

Garcia, R, Rigaud V, Huvenne, V, Morris K, Marsh, L, Köser, K, Greinert, J, Jones, D (2015) 3.1.2 Optical seafloor monitoring including image analysis techniques. MIDAS D10.1: Compilation of existing deep-sea ecosystem monitoring technologies in European research and industry: Assessment of applicability and identification of gaps, págs. 45-51.

Gauthreaux, SA(Jr), Belser, CG (2003). Radar ornithology and biological conservation. *The Auk* 120: 266–277.

Geibert, W, Stimac, I, Rutgers van der Loeff, MM, Kuhn, G (2019) Dating Deep-Sea Sediments With 230Th Excess Using a Constant Rate of Supply Model.

Paleoceanography and Paleoclimatology, 34. 1895-1912. <https://doi.org/10.1029/2019PA003663>.

GEOTRACES Cookbook: Sampling and Sample-handling Protocols for GEOTRACES Cruises (Libro de recetas, versión 3.0, 2017), <https://www.geotraces.org/methods-cookbook/>.

Giering, SLC, Cavan, EL, Basedow, SL, Briggs, N, Burd, AB, Darroch, LJ, Guidi, L, Irisson, J.-O, Iversen, MH, Kiko, R, Lindsay, D, Marcolin, CR, McDonnell, AMP, Möller, KO, Passow, U, Thomalla, S, Trull, TW, Waite, AM (2020) Sinking Organic Particles in the Ocean—Flux Estimates From *in situ* Optical Devices . Front. Mar. Sci.18. <https://doi.org/10.3389/fmars.2019.00834>.

Gieskes, J, Gamo, T, Brumsack, H (1991) Chemical methods for interstitial water analysis aboard JOIDES Resolution. ODP Tech Note, 15. Doi:10.2973/odp.tn.15.1991.

Gjerdrum, C, Fifield, DA, Wilhelm, SI (2012) Eastern Canada Seabirds at Sea (ECSAS) standardized protocol for pelagic seabird surveys from moving and stationary platforms. Canadian Wildlife Service Technical Report Series núm. 515. Atlantic Region. Vi + 37 págs.

Glover, AG, Dahlgren, TG, Wiklund, H, Mohrbeck, I, Smith, CR (2016) An end-to-end DNA taxonomy methodology for benthic biodiversity survey in the Clarion-Clipperton Zone, central Pacific abyss. Journal of Marine Science and Engineering, 4(1), 2.

Gochfeld M (1973) Effect of artefact pollution on the viability of seabird colonies on Long Island, New York. Environmental Pollution (1970) 4:1-6.

Goineau, A, Gooday, AJ (2017) Novel benthic foraminifera are abundant and diverse in an area of the abyssal equatorial Pacific licensed for polymetallic nodule exploration. Sci Rep 7: 45288 <https://doi.org/10.1038/srep45288>.

Goineau, A, Gooday, AJ, (2019) Diversity and spatial patterns of foraminiferal assemblages in the eastern Clarion–Clipperton zone (abyssal eastern equatorial Pacific). Deep-Sea Research I: <https://doi.org/10.1016/j.dsr.2019.04.014>.

Gomes-Pereira, JN, Auger, V, Beisiegel, K, Benjamin, R, Bergmann, M, Bowden, D, Buhl-Mortensen, P, De Leo, FC, Dionisio, G, Durden, JM, Edwards, L, Friedman, A, Greinert, J, Jacobsen-Stout, N, Lerner, S, Leslie, M, Nattkemper, TW, Sameoto, JA, Schoening, T, Schouten, R, Seager, J, Singh, H, Soubigou, O, Tojeira, I, van den Beld, I, Dias, F, Tempera, F, Santos, RS (2016) Current and future trends in marine image annotation software. Progress in Oceanography 149, 106-120.

Gooday, AJ, Goineau, A (2019) The contribution of fine sieve fractions (63–150 µm) to foraminiferal abundance and diversity in an area of the eastern Pacific Ocean licensed for polymetallic nodule exploration. Frontiers in Marine Science 6, <https://doi.org/10.3389/fmars.2019.00114>.

Gooday AJ, Holzmann, M, Caille, C, Goineau, A, Kamenskaya, OE, Weber, AA.-T, Pawlowski, J (2017) Giant foraminifera (xenophyophores) are exceptionally diverse in parts of the abyssal eastern Pacific where seabed mining is likely to occur. Biological Conservation 207, 106–116.

Gooday, AJ, Schoenle, A, Dolan, JR, Arndt, H (2020a) Protist diversity and function in the dark ocean – challenging the paradigms of deep-sea ecology with special emphasis on foraminiferans and naked protists. European Journal of Protistology, 75, 125721.

Gooday, AJ, Durden, JM, Smith, CR (2020b) Giant, highly diverse protists in the abyssal Pacific: vulnerability to impacts from seabed mining and potential for recovery, *Communicative & Integrative Biology*, 13:1, 189-197 <http://doi.org/10.1080/19420889.2020.1843818>.

Grasshoff, K, Kremling, K, Ehrhardt, M (eds) (1999) *Methods of seawater analysis*, tercera edición. Wiley-VCH, Weinheim, Nueva York.

Grupo de Cooperación sobre Boyas de Acopio de Datos (2011) *Sea surface salinity quality control processes for potential use on data buoy observations*. Versión 1.3, Ginebra (Suiza), Comisión Oceanográfica Intergubernamental/Organización Meteorológica Mundial, 17 págs. (DBCP Technical Document 42). <http://dx.doi.org/10.25607/OBP-415>.

Grupo de Datos e Información (DIG) del CIEM (2006) *ICES Guidelines for CTD data*. (Compilado en marzo de 2000; revisado en agosto de 2001; junio de 2006) Copenhague (Dinamarca), Consejo Internacional para la Exploración del Mar (CIEM), 9 págs. <http://hdl.handle.net/11329/244>.

Haffert, L, Haeckel, M, Liebetau, V, Berndt, C, Hensen, C, Nuzzo, M, Reitz, A, Scholz, F, Schönfeld, J, Perez-Garcia, C, Weise, SM (2013) Fluid evolution and authigenic mineral paragenesis related to salt diapirism – The Mercator mud volcano in the Gulf of Cadiz, *Geochimica et Cosmochimica Acta* 106: 261-286, doi: 10.1016/j.gca.2012.12.016.

Harbour RP, Leitner AB, Ruehleman C, Vink A. and Sweetman AK, 2020. Benthic and Demersal Scavenger Biodiversity in the Eastern End of the Clarion-Clipperton Zone – An Area Marked for Polymetallic Nodule Mining. *Front. Mar. Sci.* 7:458. <https://doi.org/10.3389/fmars.2020.00458>.

Hardy *et al.*, 2008,

Heger A, Ieno EN, King NJ, Morris K. J, Bagley PM, Priede IG, (2008) Deep-sea pelagic bioluminescence over the Mid-Atlantic Ridge. *Deep Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography* 55: 126-136. <https://doi.org/10.1016/j.dsr2.2007.09.014>.

Henson SA, Sarmiento JL, Dunne JP, Bopp L, Lima I, Doney SC, John J, Beaulieu C (2010) Detection of anthropogenic climate change in satellite records of ocean chlorophyll and productivity. *Biogeosciences* 7 (2), 621-640.

Hessler and Jumars (1974) Abyssal community analysis from replicate box cores in the central North Pacific. *Deep-Sea Research* 21, 185-209.

Hofmann AF, Soetaert K, Middelburg JJ, Meysman FJR (2010) AquaEnv: An aquatic acid–base modelling environment in R. *Aquatic Geochemistry* 16, 507-546.

Howell KL, Davies JS, Allcock AL, Braga- Henriques A, Buhl-Mortensen P, Carreiro-Silva M, *et al.* (2019) A framework for the development of a global standardised marine taxon reference image database (SmarTaR-ID) to support image-based analyses. *PloS ONE* 14(12): e0218904. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0218904>.

Huffard, CL, Durkin, CA, Wilson, SE, McGill, PR, Henthorn, R, Smith, KL, (2020) Temporally-resolved mechanisms of deep-ocean particle flux and impact on the seafloor carbon cycle in the northeast Pacific. *Deep Sea Res. Part II Top. Stud. Oceanogr.* 173, 104763. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.dsr2.2020.104763>.

ISA Technical Study núm. 7: *Marine Benthic Nematode Molecular Protocol Handbook (Nematode Barcoding)*.

- ISA Technical Study núm. 13: Deep Sea Macrofauna of the Clarion-Clipperton Zone.
- Ishii, M, Kosugi, N (2020) Determination of total alkalinity in sea water by spectrophotometry, in: Otosaka, S, Ueki, I, Sasano, D, Kumamoto, Y, Obata, H, Fukuda, H, Nishibe, Y, Maki, H, Goto, K, Aoyama, M, Ono, T (Eds.), *Guideline of Ocean Observation*, cuarta edición. The Oceanographic Society of Japan, Tokyo (Japón), págs. G305EN001-G305EN012.
- Jaijel, R, Tchernov, BN, Biton, E, Weinstein, Y, Katz, T (2021). Optimizing a standard preparation procedure for grain size analysis of marine sediments by laser diffraction (MS-PT4SD: Marine sediments-pretreatment for size distribution). *Deep-Sea Research I*, 167, 103429. <https://doi.org/10.1016/j.dsr.2020.103429>.
- Jamieson, AJ (2015) *The hadal zone: Life in the deepest Oceans*. Cambridge University Press.
- Janssen, A, Kaiser, S, Meissner, K, Brenke, N, Menot, L, Arbizu, PM (2015) A reverse taxonomic approach to assess macrofaunal distribution patterns in abyssal Pacific polymetallic nodule fields. *Plos one*, 10(2).
- Jombart, T, Devillard, S, Balloux, F (2010) Discriminant analysis of principal components: a new method for the analysis of genetically structured populations. *BMC Genetics*, 11, 94.
- Joseph, A (2014) Eulerian-Style Measurements Incorporating Mechanical Sensors. *Measuring Ocean Currents*, 241–265. Doi:10.1016/b978-0-12-415990-7.00008-9.
- Jumars, PA (1981) Limits in predicting and detecting benthic community responses nodule mining. *Marine Mining*, 3: 213- 229.
- Jombart, T, Devillard, S, Balloux, F (2010) Discriminant analysis of principal components: a new method for the analysis of genetically structured populations. *BMC Genetics*, 11, 94.
- Karstensen, J (2005) How to process mooring data? A cookbook for MicroCat, ADCP and RCM data. Kiel, Germany, IFM-GEOMAR, Universitat Kiel, 44 págs. <http://dx.doi.org/10.13140/RG.2.1.2514.7044>.
- Klaas C, Archer DE (2002) Association of sinking organic matter with various types of mineral ballast in the deep sea: Implications for the rain ratio. *Global Biogeochem. Cycles*. 16(4), 1116, <https://doi.org/10.1029/2001GB001765>.
- Klevjer, TA, Irigoien, X, Røstad, A, Fraile-Nuez, E, Benítez-Barrios, VM, Kaartvedt, S (2016) Large scale patterns in vertical distribution and behaviour of mesopelagic scattering layers. *Sci. Rep.* 6, 19873, <https://doi.org/10.1038/srep19873>.
- Knap, A, Michaels, A, Close, A, Ducklow, H, Dickson, A (eds.) (1996) *Protocols for the Joint Global Ocean Flux Study (JGOFS) Core Measurements*. JGOFS Report Nr. 19, vi+170 págs. Reprint of the IOC Manuals and Guides núm. 29, UNESCO 1994.
- Knight, RD, Roberts, S, Cooper, MJ (2018) Investigating monomineralic and polymineralic reactions during the oxidation of sulphide minerals in seawater: Implications for mining seafloor massive sulphide deposits. *Applied Geochemistry* 90: 63-74.
- Kong, RYC, Giesy, JP, Wu, RSS, Chen, EXH, Chiang, MWL, Lim, PL, Yuen, BBH, Yip, BWP, Mok, HOL, Au, DWT (2008) Development of a marine fish model for studying in vivo molecular responses in ecotoxicology. *Aquatic Toxicology* 86: 131-141. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2007.10.011>.
- Kossel, E, Bigalke, N, Pintero, E, Haeckel, M (2013) *The SUGAR Toolbox: a library of numerical algorithms and data for modelling of gas hydrate systems and marine*

- environments. GEOMAR Report 8, GEOMAR Helmholtz Centre for Ocean Research Kiel, 160 p, <https://doi.pangaea.de/10.1594/PANGAEA.846280>.
- Kuhn, G (2013) Don't forget the salty soup: Calculations for bulk marine geochemistry and radionuclide geochronology. Goldschmidt 2013, Florencia (Italia), 25 a 30 de agosto de 2013. Doi:10.1180/minmag.2013.077.5.11.
- Kuhner, MK (2006) lamarc 2.0: Maximum likelihood and Bayesian estimation of population parameters. *Bioinformatics*, 22, 768–770.
- Labrenz, M, Brettar, I, Christen, R, Flavier, S, Botel, J, Holfe, MG (2004) Development and application of a real-time PCR approach for quantification of uncultured bacteria in the central Baltic Sea. *Appl Environ Microbiol*, 70(8), 4971-4979. <https://doi.org/10.1128/aem.70.8.4971-4979.2004>.
- Lam, PJ, Lee, JM, Heller, MI, Mehic, S, Xiang, Y, Bates, NR (2018). Size-fractionated distributions of suspended particle concentration and major phase composition from the U.S. GEOTRACES eastern Pacific zonal transect (GP16). *Marine Chemistry*, 201, 90– 107. <https://doi.org/10.1016/j.marchem.2017.08.013>.
- Lamarche, G, Lurton, X (2018) Recommendations for improved and coherent acquisition and processing of backscatter data from seafloor-mapping sonars *Mar. Geophys. Res.* 39:5–22. <https://doi.org/10.1007/s11001-017-9315-6>.
- Langdon, C (2010) Determination of Dissolved Oxygen in Seawater By Winkler Titration using Amperometric Technique. In, *The GO-SHIP Repeat Hydrography Manual: A Collection of Expert Reports and Guidelines. Versión 1*, (eds Hood, E.M., C.L. Sabine, and B.M. Sloyan). 18 págs. (IOCCP Report Number 14; ICPO Publication Series Number 134). Se encuentra en línea en: <http://www.go-ship.org/HydroMan.html>.
- Langenkämper, D, Zurowietz, M, Schoening, T, Nattkemper, TW (2017) BIIGLE 2.0 – Browsing and Annotating Large Marine Image Collections. *Frontiers in Marine Science* 4 (83).
- Lao, Y, Anderson RF, Broecker, WS, Trumbore, SE, Hofmann, HJ, Wolfli, W (1992) Transport and Burial Rates of Be-10 and Pa-231 in the Pacific-Ocean During the Holocene Period. *Earth and Planetary Science Letters* 113, 173-189. [https://doi.org/10.1016/0012-821X\(92\)90218-K](https://doi.org/10.1016/0012-821X(92)90218-K).
- Le Menn, M, Poli, P, David, A, Sagot, J, Lucas, M, O'Carroll, A, Belbeoch, M. and Herklotz, K (2019) Development of Surface Drifting Buoys for Fiducial Reference Measurements of Sea-Surface Temperature. *Frontiers in Marine Science*, 6:578 12 págs. <https://doi.org/10.3389/fmars.2019.00578>.
- Levin, LA, Mendoza, GF, Konotchick, T, Lee, R (2009) Community structure and trophic relationships in Pacific hydrothermal sediments. *Deep-Sea Res II* 56: 1632–1648.
- Longhurst, A (1998) *Ecological Geography of the Sea*. Academic Press, Nueva York.
- Luff, R, Haeckel, M, Wallmann, K (2001) Robust and fast FORTRAN and MATLAB libraries to calculate pH distributions in a non-steady state model for aqueous systems. *Computers & Geosciences* 27, 157-169.
- Lumpkin, R, Özgökmen, T, Centurioni, L (2017) Advances in the Application of Surface Drifters. *Annual Review of Marine Science*, 9(1), 59–81. <https://doi.org/10.1146/annurev-marine-010816-060641>.
- Macheriotou L, Rigaux A, Derycke S, Vanreusel A (2020) Phylogenetic clustering and rarity imply risk of local species extinction in prospective deep-sea mining areas

of the Clarion–Clipperton Fracture Zone. *Proc. R. Soc. B* 287 <http://dx.doi.org/10.1098/rspb.2019.2666>.

Manni, F, Guerard, E, Heyer, E (2004) Geographic patterns of (genetic, morphologic, linguistic) variation: How barriers can be detected by using Monmonier's algorithm. *Human Biology*, 76, 173–190.

Marsaglia, K, Milliken, K, Doran, L (2013) IODP digital reference for smear slide analysis of marine mud. Part 1: Methodology and atlas of siliciclastic and volcanogenic components. IODP Technical Note 1. <http://iodp.tamu.edu/publications/TN/TN1-SS-Pt1-Atlas-inter.pdf>.

Marsaglia, K, Milliken, K, Leckie, R, M, Tentori, D, Doran, L (2015) IODP Smear Slide Digital Reference for Sediment Analysis of Marine Mud. Part 2: Methodology and Atlas of Biogenic Components. IODP Technical Note 2. [http://iodp.tamu.edu/publications/TN/Tnote\\_2.pdf](http://iodp.tamu.edu/publications/TN/Tnote_2.pdf).

Marsaglia, K, Shapiro, S, Doran, L, Tentori, D (2015) ODP Core Photo Atlas. IODP Technical Note 3. [http://iodp.tamu.edu/publications/TN/Tnote\\_3.pdf](http://iodp.tamu.edu/publications/TN/Tnote_3.pdf).

Mazzullo, J, Graham, AG (Eds.), 1988. Handbook for shipboard sedimentologists. ODP Tech. Note, 8. Doi:10.2973/odp.tn.8.1988.

McCord, JM, Fridovich, I (1969) Superoxide dismutase: an enzymic function for erythrocyte hemocuprein (hemocuprein). *Journal of Biological Chemistry* 244: 6049–6055.

McDonnell, AMP, Lam, PJ, Lamborg, CH, Buesseler, KO, Sanders, R, Riley, JS, Marsay, C, Smith, HEK, Sargent, EC, Lampitt, RS, Bishop, JKB (2015) The oceanographic toolbox for the collection of sinking and suspended marine particles. *Prog. Oceanogr.* 133: 17–31. <http://dx.doi.org/10.1016/j.pocean.2015.01.007>.

McIntyre, AD, Warwick, RM, (1984) Meiofaunal techniques, In: Holme, NA, McIntyre, AD (Eds.), *Methods for the Study of the Marine Benthos*, 2nd ed. Blackwell Scientific Publications, Oxford, págs. 217–244 (IBP Handbook, núm. 16).

McQuaid KA, Attrill MJ, Clark MR, Copley A, Glover AG, Smith CR, Howell KL (2020) Using habitat classification to assess representativity of a protected area network in a large, data-poor area targeted for deep-sea mining. *Frontiers in Marine Science*, 7: 1066 <https://doi.org/10.3389/fmars.2020.558860>.

McTaggart, KE, Johnson, GC, Delahoyde, MCFH, Swift, JH (2010) Notes on CTC/O2 Data Acquisition and Processing Using Sea-Bird Hardware and Software (As Available). In, *The GO-SHIP Repeat Hydrography Manual: A Collection of Expert Reports and Guidelines. Versión 1*, (eds Hood, E.M., C.L. Sabine, and B.M. Sloyan). 10 págs. (IOCCP Report Number 14; ICPO Publication Series Number 134). Se encuentra en línea en: <http://www.go-ship.org/HydroMan.html>.

Meckler, AN, Schubert, CJ, Cowie, GL, Peiffer, S, Dittrich, M (2004) New organic matter degradation proxies: Valid in lake systems? *Limnology and Oceanography* 49(6): 0024-3590, <https://doi.org/10.4319/lo.2004.49.6.2023>.

Meirmans PG, Van Tienderen PH (2004) GENOTYPE and GENODIVE: Two programs for the analysis of genetic diversity of asexual organisms. *Molecular Ecology Notes*, 4, 792–794.

Mestre, NC, Rocha, TL, Canals, M, Cardoso, C, Danovaro, R, Dell'Anno, A, Gambi, C, Regoli, F, Sanchez-Vidal, A, Bebianno, MJ (2017) Environmental hazard assessment of a marine mine tailings deposit site and potential implications for deep-sea mining. *Environ. Pollut.* 228, 169–178. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.05.027>.

- Mewes, K, Mogollón, J. M, Picard, A, Rühlemann, C, Kuhn, T, Nöthen, K, Kasten, S (2014) Impact of depositional and biogeochemical processes on small scale variations in nodule abundance in the Clarion-Clipperton Fracture Zone, Deep Sea Research Part I 91: 125-141, <https://doi.org/10.1016/j.dsr.2014.06.001>.
- Millero, FJ (2013). Chemical Oceanography, 4th Edn. Boca Raton, FL: CRC Press, 552.
- Moore C, Barnard, A, Fietzek, P, Lewis, M, Sosik, H, White, S, Zielinski, O (2009) Optical tools for ocean monitoring and research. Ocean Science. 661-684. <https://doi.org/10.5194/os-5-661-2009>.
- Mourgaud, Y, Martinez, E, Geffard, A, Andral, B, Stanisiere, JY, Amiard, JC (2002) Metallothionein concentration in the mussel *Mytilus galloprovincialis* as a biomarker of response to metal contamination: validation in the field. Biomarkers. 7(6):479-490. <https://doi.org/10.1080/1354750021000034528>.
- Nöthen, K, Kasten, S (2011). Reconstructing changes in seep activity by means of pore water and solid phase Sr/Ca and Mg/Ca ratios in pockmark sediments of the Northern Congo Fan. Mar. Geol. 287, 1–13. <https://doi.org/10.1016/j.margeo.2011.06.008>.
- National Measurement Office, Marine Scotland, The Crown Estate, Robinson SP, Lepper PA, Hazelwood RA (2014) NPL Good Practice Guide núm. 133: Good Practice Guide for Underwater Noise Measurement, ISSN: 1368-6550, 2014.
- Numerical Models of Oceans and Oceanic Processes (2000) Edited by Lakshmi H. Kantha, Carol Anne Clayson. Volumen 66, págs. 1-940.
- Ocean Best Practices System (2020) Best Practices document template: data management. Versión 6. Oostende, Belgium, International Oceanographic Data and Information Exchange (IODE) for Ocean Best Practices System, 12 págs. <http://dx.doi.org/10.25607/OBP-760>.
- Ogashawara, I (2015) Terminology and classification of bio-optical algorithms. Remote Sensing Letters 6, 613–617.
- Organización Hidrográfica Internacional (2019) B-6, Standardization of Undersea Feature Names, Guidelines Proposal Form Terminology, Ed.4.2, 43 págs. [https://iho.int/uploads/user/pubs/bathy/B-6\\_e4%20%200\\_2019\\_EF\\_clean\\_3\\_Oct2019.pdf](https://iho.int/uploads/user/pubs/bathy/B-6_e4%20%200_2019_EF_clean_3_Oct2019.pdf).
- Organización Hidrográfica Internacional (2020) S-44, Standards for Hydrographic Surveys, edición 6.0.0. 46 págs. [https://iho.int/uploads/user/pubs/standards/s-44/S-44\\_Edition\\_6.0.0\\_EN.pdf](https://iho.int/uploads/user/pubs/standards/s-44/S-44_Edition_6.0.0_EN.pdf).
- Orr, JC, Epitalon, JM, Dickson, AG, Gattuso, JP (2018) Routine uncertainty propagation for the marine carbon dioxide system. Mar. Chem. 207, 84–107.
- Paul, SAL, Gaye, B, Haeckel, M, Kasten, S, Koschinsky, A (2018) Biogeochemical Regeneration of a Nodule Mining Disturbance Site: Trace Metals, DOC and Amino Acids in Deep-Sea Sediments and Pore Waters. Front. Mar. Sci. 5, 1–17. <https://doi.org/10.3389/fmars.2018.00117>.
- Petihakis, G, Haller, M, Petersen, W, Nair, R, Seppälä, J. and Salvetat, F (2014) JERICO Report on Calibration Best Practices: D4.2 (Versión 1.3 - 27/06/14). Issy-les-Moulineaux, France, Ifremer for JERICO Project, 61 págs. <https://doi.org/10.13155/49740>.
- Pham, M, Sanchez-Cabeza, J, Povinec, P, Andor, K, Arnold, D, Benmansour, M, *et al*, International Atomic Energy Agency, (2008) A new certified reference material for

- radionuclides in Irish Sea sediment (IAEA-385). *Applied Radiation and Isotopes*, 66(11), 1711–1717. <https://doi.org/10.1016/j.apradiso.2007.10.020>.
- Pham, MK, Betti, M, Povinec, PP., *et al.* (2011) A certified reference material for radionuclides in the water sample from Irish Sea (IAEA-443), *J Radioanal Nucl Chem* 288, 603–611, <https://doi.org/10.1007/s10967-010-0976-8>.
- Planquette, Hélène, Sherrell, Robert M., (2012), Sampling for particulate trace element determination using water sampling bottles: methodology and comparison to *in situ* pumps, *Limnol. Oceanogr. Methods*, 10, <https://doi.org/10.4319/lom.2012.10.367>.
- Pritchard, JK, Stephens M, Donnelly P (2000) Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*, 155, 954–959.
- Proud, R, Cox, MJ, Brierley AS (2017) Biogeography of the Global Ocean's Mesopelagic Zone. *Current Biology* 27, 113–119 <http://dx.doi.org/10.1016/j.cub.2016.11.003>.
- Przeslawski, R, Berents, P, Clark, M, Edgar, G, Frid, C, Hughes, L, Ingleton, T, Kennedy, D, Nichol, S, Smith, J, (2018) Marine Sampling Field Manual for Grabs and Box Corers [Versión 1]. In: *Field Manuals for Marine Sampling to Monitor Australian Waters, Versión 1* (eds Przeslawski, R. and Foster, S.). Canberra, Australia, NESP Marine Biodiversity Hub, págs. 172-195.
- Pusceddu, A, Dell'Anno, A, Fabiano, M, Danovaro, R (2009) Quantity and bioavailability of sediment organic matter as signatures of benthic trophic status. *Mar Ecol Prog Ser* 375:41-52, <https://doi.org/10.3354/meps07735>.
- Regoli, F, d'Errico, G, Nardi, A, Mezzelani, M, Fattorini, D, Benedetti, M, Di Carlo, M, Pellegrinni, D, Gorbi, S (2019) Application of a Weight of Evidence Approach for monitoring complex environmental scenarios: the case-study of off-shore platforms. *Frontiers Marine Science* <https://doi.org/10.3389/fmars.2019.00377>.
- Revsbech, NP, Jørgensen, BB (1986) Microelectrodes and their use in microbial ecology, in: Marshall KC (Ed.), *Advances in Microbial Ecology*. Plenum Press, Nueva York, págs. 293-352.
- Robinson IS. *Measuring the Oceans from Space. The principles and methods of satellite oceanography* (2004) ISBN 978-3-540-42647-9.
- Robinson, SP, Lepper, PA, Hazelwood, RA (2014) *Good Practice Guide for Underwater Noise Measurement*. Teddington, England, National Measurement Office, Marine Scotland, The Crown Estate, 95 págs. (NPL Good Practice Guide núm. 133).
- Ronconi, RA, Burger, AE (2009) Estimating seabird densities from vessel transects: distance sampling and implications for strip transects. *Aquatic Biology*, 4(3), 297-309.
- Rothwell, RG, Rack, FR (2006) New techniques in sediment core analysis: an introduction. In: Rothwell, RG, (ed.) *New techniques in sediment core analysis*. Londres (Reino Unido), Geological Society of London, 1-29, 266 págs. (Geological Society Special Publication, 267). <https://doi.org/10.1144/GSLSP.2006.267.01.01>.
- Schoening, T, Osterloff, J, Nattkemper, TW, 2016. RecoMIA—Recommendations for Marine Image Annotation: Lessons Learned and Future Directions. *Frontiers in Marine Science* 3 (59).
- Schönfeld, J, Alve, E, Geslin, E, Jorissen, FJ, Korsun, S, Spezzaferri, S, Members of the FOBIMO group (2012) *The FOBIMO (Foraminiferal Bio-Monitoring)*

initiative-Towards a standardised protocol for soft-bottom benthic foraminiferal monitoring studies. *Marine Micropaleontology* 94-95, 1-13.

Sgih, HH, Sprenke, J, Payton, C. and Mero, T (2001) Towing Basin Speed Verification of Acoustic Doppler Current Profiling Instruments. Silver Spring, MD, NOAA NOS Center for Operational Oceanographic Products and Services, 53 págs. (NOAA Technical Report NOS CO-OPS 033). DOI: <http://dx.doi.org/10.25607/OBP-139>.

Simon-Lledo E, Bett BJ, Huvenne VAI, Schoening T, Benoist NMA, Jeffreys RM, Durden JM, Jones DOB (2019). Megafaunal variation in the abyssal landscape of the Clarion Clipperton Zone. *Progress in Oceanography*, 170, 119–133. <https://doi.org/10.1016/j.pocean.2018.11.003>.

Simpson, S, Batley, G (eds) (2016) Sediment quality assessment: a practical guide. Segunda edición. Clayton, Australia, CSIRO Publishing, 346 págs. <http://dx.doi.org/10.25607/OBP-498>.

Sistema Integrado de Observación de los Océanos de los Estados Unidos (2016) Manual for Quality Control of Temperature and Salinity Data Observations from Gliders. Versión 1.0. Silver Spring, MD (Estados Unidos) Departamento de Comercio, Oficina Nacional de Administración Oceánica y Atmosférica, Servicio Oceánico Nacional, Sistema Integrado de Observación de los Océanos, 23 págs. y apéndices. <http://hdl.handle.net/11329/289>.

Sistema Integrado de Observación de los Océanos de los Estados Unidos (2017) Manual for Real-Time Quality Control of Passive Acoustics Data: A Guide to Quality Control and Quality Assurance for Passive Acoustics Observations. Silver Spring, MD (Estados Unidos). Departamento de Comercio, Oficina Nacional de Administración Oceánica y Atmosférica, Servicio Oceánico Nacional, Sistema Integrado de Observación de los Océanos, 24 págs. y apéndices. <http://hdl.handle.net/11329/342>.

Sistema Integrado de Observación de los Océanos de los Estados Unidos (2019a), Manual for Real-Time Quality Control of *In-Situ* Current Observations. Versión 2.1. Silver Spring, MD (Estados Unidos). Departamento de Comercio, Oficina Nacional de Administración Oceánica y Atmosférica, Servicio Oceánico Nacional, Sistema Integrado de Observación de los Océanos, 54 págs. <https://doi.org/10.25923/sqe9-e310>.

Sistema Integrado de Observación de los Océanos de los Estados Unidos (2020) Manual for Real-Time Oceanographic Data Quality Control Flags. Versión 1.2. Silver Spring, MD (Estados Unidos). Departamento de Comercio, Oficina Nacional de Administración Oceánica y Atmosférica, Servicio Oceánico Nacional, Sistema Integrado de Observación de los Océanos, 24 págs. <https://doi.org/10.25923/w8y6-d298>.

Sistema Integrado de Observación de los Océanos de los Estados Unidos (2020) Manual for Real-Time Quality Control of *In-situ* Temperature and Salinity Data Versión 2.1: a Guide to Quality Control and Quality Assurance of *In-situ* Temperature and Salinity Observations. Silver Spring, MD (Estados Unidos). Departamento de Comercio, Oficina Nacional de Administración Oceánica y Atmosférica, Servicio Oceánico Nacional, Sistema Integrado de Observación de los Océanos, 50 págs. <https://doi.org/10.25923/x02m-m555>.

Stewart, RH (1985) *Methods of Satellite Oceanography*. 360 págs. Berkeley, Los Ángeles, Londres: University of California Press. ISBN 0-520-04226-3. <https://doi.org/10.1017/S0016756800026674>.

Stratmann, T, Mevenkamp, L, Sweetman, AK, Vanreusel, A, Van Oevelen, D (2018) Has phytodetritus processing by an abyssal soft-sediment community recovered 26 years after an experimental disturbance? *Frontiers in Marine Science*, 5, 59, 2018.

- Sutton, TT, Clark MR, Dunn DC, Halpin PN, Rogers AD, Guinotte J, Bograd SJ, Angel MV, Perez JAA, Wishner K, Haedrich RL, Lindsay DJ, Drazen JC, Vereshchakam A, Piatkowski U, Morato T, Błachowiak-Samołyk K, Robison BH, Gjerder KM, Pierrot-Bults A, Bernalt P, Reygondeau G, Heino M (2017) A global biogeographic classification of the mesopelagic zone: An aid for marine conservation planning. *Deep-Sea Research I*. 126: 85-102 <https://doi.org/10.1016/j.dsr.2017.05.006>.
- Sweetman, AK, Middelburg, JJ, Berle, AM, Bernadino, AF, Schander, C, Demopoulos, AWJ, Smith CR (2010) Impacts of exotic mangrove forests and mangrove deforestation on carbon remineralization and ecosystem functioning in marine sediments. *Biogeosciences*, 7, 2129 – 2145.
- Sweetman AK, Levin, LA, Rapp, HT, Schander, C (2013) Faunal trophic structure at hydrothermal vents on the southern Mohn's Ridge, Arctic Ocean. *Marine Ecology Progress Series*, 473, 115-131.
- Sweetman, AK, Smith, CR, Shulse, CN, Maillot, B, Lindh, M, Church, MJ, Meyer, KS, Van Oevelen, D, Stratmann, T, Gooday, AJ (2019) Key role of bacteria in the short-term cycling of carbon at the abyssal seafloor of the eastern Clarion Clipperton Fracture Zone. *Limnology and Oceanography*, 64(2): 694-713.
- Taboada S, Riesgo A, Wiklund H, Paterson GLJ, Koutsouveli V, Santodomingo N, Dale AC, Smith CR, Jones DOB, Dahlgren TG, Glover AG (2018) Implications of population connectivity studies for the design of marine protected areas in the deep sea: An example of a demosponge from the Clarion-Clipperton Zone. *Molecular Ecology*, 27(23) 4657–4679. <https://doi.org/10.1111/mec.14888>.
- Talley, LD, Pickard, GL, Emery, WJ, Swift, JH (2011) Instruments and Methods. S16. Págs. 1-77. *Descriptive Physical Oceanography. An Introduction. Sexta edición.*
- Tamburri, M (2006) Protocols for Verifying the Performance of *In Situ* Turbidity Sensor. Solomons, MD, Alliance for Coastal Technologies, 22 págs. (ACTPV0601 5/3/06). <http://dx.doi.org/10.25607/OBP-347>.
- Thurnherr, AM, Visbeck, M, Firing, E, King, BA, Hummon, JM, Krahnemann, G, Huber, B (2010) A - The GO-SHIP Repeat Hydrography Manual: A Collection of Expert Reports and Guidelines. IOCCP Report núm. 1, ICPO Publications Series núm. 134, Versión 1, 2010. <http://www.go-ship.org/HydroMan.html>.
- Thomson, RE, Emery, WJ (2014) Data Acquisition and Recording. *Data Analysis Methods in Physical Oceanography*, 1–186. Doi:10.1016/b978-0-12-387782-6.00001-6.
- Thorpe, SA (2007) *The Turbulent Ocean*, Cambridge University Press, Nueva York, 439 págs.
- Uchida, H, Johnson, GC, McTaggart, GC (2010) CTD Oxygen Sensor Calibration Procedures. In, *The GO-SHIP Repeat Hydrography Manual: A Collection of Expert Reports and Guidelines. Versión 1*, (eds Hood, E.M., C.L. Sabine, and B.M. Sloyan), 17 págs. (IOCCP Report Number 14; ICPO Publication Series Number 134). Se encuentra en línea en: <http://www.go-ship.org/HydroMan.html>.
- van Sebille, E, Griffies, SM, Abernathy, R, *et al* (2018) Lagrangian ocean analysis: Fundamentals and practices. *Ocean Modelling*, 121, págs. 49-75. <https://doi.org/10.1016/j.ocemod.2017.11.008>.
- Verfuss, UK, Gillespie, D, Gordon, J, Marques, TA, Miller, B, Plunkett, R, Theriault, JA, Tollit, DJ, Dominic J, Zitterbart, DP, Hubert, P, Thomas, L (2018) Comparing methods suitable for monitoring marine mammals in low visibility conditions during

- seismic surveys. *Marine Pollution Bulletin* 126 1-18, <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2017.10.034>.
- Wallmann, K, Aloisi, G, Haeckel, M, Obzhairov, A, Pavlova, G, Tishchenko, P (2006) Kinetics of organic matter degradation, microbial methane generation, and gas hydrate formation in anoxic marine sediments, *Geochimica et Cosmochimica Acta* 70(15): 3905-3927, <https://doi.org/10.1016/j.gca.2006.06.003>.
- Watling L, Guinotte J, Clark MR, Smith CR (2013) A proposed biogeography of the deep ocean floor. *Progress in Oceanography* 111: 91-112. <http://dx.doi.org/10.1016/j.pocean.2012.11.003>.
- Wenneck, T deL, Falkenhaus, T, Bergstad, OA (2008) Strategies, methods and technologies adopted on the RV G.O. Sars MAR-ECO expedition to the Mid-Atlantic Ridge in 2004. *Deep-Sea Research II* 55, 6–28.
- Wenzhöfer, F, Adler, M, Kohls, O, Hensen, C, Strotmann, B, Boehme, S, Schulz, HD (2001) Calcite dissolution driven by benthic mineralization in the deep-sea: *In situ* measurements of Ca<sup>2+</sup>, pH, pCO<sub>2</sub> and O<sub>2</sub>. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 65(16), 2677-2690.
- Werdell, PJ, McKinna, LIW, Boss, E, Ackleson, SG, Craig, SE, Gregg, WW, Lee Z, Maritorena S, Roesler CS, Rousseaux CS, Stramski D, Sullivan JM, Twardowski MS, Tzortziou M, Zhang, X (2018). An overview of approaches and challenges for retrieving marine inherent optical properties from ocean color remote sensing. *Progress in Oceanography*, 160, 186–212. <https://doi.org/10.1016/j.pocean.2018.01.001>.
- Wong, GSK, Zhu, S (1995) Speed of sound in seawater as a function of salinity, temperature, and pressure. *Journal of the Acoustical Society of America*. 97(3): 1732—1736. <https://doi.org/10.1121/1.413048>.
- Woo, LM (2019) Ocean Glider delayed mode QA/QC best practice manual, Versión 2.1. Hobart, Australia, Integrated Marine Observing System, 59 págs. <http://dx.doi.org/10.26198/5c997b5fdc9bd>.
- Yoder, M, Irma Tandingan De Ley, I, King, IW, Mundo-Ocampo, M, Mann, J, Blaxter, M, Poiras, L, De Ley, P (2006) DESS: a versatile solution for preserving morphology and extractable DNA of nematodes. *Nematology*, 2006, Vol. 8(3), 367-376.
- Yokoyama, Y, Nguyen, HV (1980) Direct and non-destructive dating of marine sediments, manganese nodules, and corals by high resolution gamma-ray spectrometry. In: *Isotope marine chemistry*, edited by E.D. Goldberg and Y. Horibe, págs. 259-289, Tokyo, 1980.
- Zeebe, RE, Wolf-Gladrow, D (2001) *CO<sub>2</sub> in Seawater: Equilibrium, Kinetics, Isotopes*. Elsevier, Amsterdam, 346 págs.

## IX. Abreviaciones y acrónimos

ADCP	medidor Doppler acústico de corrientes marinas
ADN	ácido desoxirribonucleico
ADNa	ácido desoxirribonucleico ambiental
ADP	medidor Doppler acústico
ADV	velocímetro Doppler acústico
AEE	Agencia Espacial Europea
AICFO	Asociación Internacional para las Ciencias Físicas del Océano
ARN	ácido ribonucleico
ARNr	ácido ribonucleico ribosómico
AUV	vehículo submarino autónomo
AVHRR	radiómetro avanzado de muy alta resolución
CIEM	Consejo Internacional para la Exploración del Mar
CNS	carbono, nitrógeno y azufre
COI	Comisión Oceanográfica Intergubernamental de la Organización de las Naciones Unidas para la Educación, la Ciencia y la Cultura
CTD	conductividad, temperatura y profundidad
DCP	medidor Doppler de corrientes marinas
ddRADseq	secuenciación de ADN asociada a sitios de restricción con doble digestión
DESS	solución de dimetilsulfóxido y ácido etilendiaminotetracético disódico, saturada con sal
ECHA	Agencia Europea de Sustancias y Mezclas Químicas
EPA	Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos
EuroGOOS DATA-MEQ	Grupo de trabajo sobre la gestión, el intercambio y la calidad de los datos del Sistema Mundial de Observación del Océano europeo
FAU	unidades de atenuación de formacina
FNU	unidad nefelométrica de formacina
GOOS	Sistema Mundial de Observación del Océano
Go-Ship	Programa mundial de investigaciones hidrográficas oceánicas a bordo de buques
IMOS	Sistema Integrado de Observaciones Marinas
IODE	Intercambio Internacional de Datos e Información Oceanográficos
IRZ	zona de referencia para los efectos

---

ISO	International Organization for Standardization
JAXA	Organismo de Exploración Aeroespacial del Japón
JGOFS	Estudio Conjunto de los Flujos Oceánicos Mundiales
LADCP	medidor Doppler acústico reducido de corrientes marinas
MCR	correntómetro de rotor
MERIS	espectrómetro formador de imágenes de resolución media
MOCNESS	sistema de detección ambiental y de redes de apertura y cierre múltiples
MODIS	espectrómetro de formación de imágenes de resolución moderada
NASA	Administración Nacional de Aeronáutica y el Espacio
NOAA	Oficina Nacional de Administración Oceánica y Atmosférica
NTU	unidades nefelométricas de turbidez
OIEA	Organismo Internacional de Energía Atómica
PIPS	silicio plano implantado y pasivado
PRZ	zona de referencia para la preservación
RADseq	secuenciación de ADN asociada a sitios de restricción
rcf	fuerza centrífuga relativa
RCP	reacción en cadena de la polimerasa
ROV	vehículo operado por control remoto
SeaWiFS	sensor de gran campo de visión para observar el mar
SIG	sistema de información geográfica
TEOS-10	ecuación termodinámica del agua de mar (2010)

---