



**VNiVERSIDAD
D SALAMANCA**

CAMPUS DE EXCELENCIA INTERNACIONAL

**El uso de luz polarizada circular para el
estudio de los cocolitos y otros nanofósiles
calcáreos**

**Tesis doctoral
Miguel Ángel Fuertes Prieto
Salamanca, 2016**



VNiVERSiDAD
D SALAMANCA

CAMPUS DE EXCELENCIA INTERNACIONAL

El uso de luz polarizada circular para el estudio de los cocolitos y otros nanofósiles calcáreos

Memoria presentada por Miguel Ángel Fuertes Prieto para
optar al grado de Doctor en Geología por la Universidad de
Salamanca con mención

“Doctor Internacional”

Directores de la Tesis:

Dr. José Abel Flores Villarejo

Catedrático del Departamento de Geología (Paleontología)

Universidad de Salamanca

Dr. Francisco Javier Sierra Sánchez

Catedrático del Departamento de Geología (Paleontología)

Universidad de Salamanca

Salamanca, 2016

D. José Abel Flores Villarejo y D. Francisco Javier Sierra Sánchez, profesores del Área de Paleontología en el Departamento de Geología de la Facultad de Ciencias (Universidad de Salamanca)

CERTIFICAN:

Que **Miguel Ángel Fuertes Prieto** ha realizado en el Departamento de Geología de la Universidad de Salamanca y bajo nuestra supervisión el trabajo:

El uso de luz polarizada circular para el estudio de los cocolitos y otros nanofósiles calcáreos

Y para que así conste, firmamos el presente certificado en Salamanca, en enero de 2016:

Los directores

Dr. José Abel Flores Villarejo

Dr. Francisco Javier Sierra Sánchez

El doctorando

Miguel Ángel Fuertes Prieto



*A mi padre, por el pasado,
a mi hijo, por el futuro,
y a Eugenia, que es la que está detrás del objetivo.*

Fue entonces cuando vi el Péndulo.

El péndulo de Foucault, Umberto Eco

Índice

Resumen	9
Abstract	13
Presentación y justificación	17
Objetivos	19
Estructura de la tesis doctoral	21
Capítulo I: Cocolitos y luz polarizada	25
Cocolitos	25
Cocolitóforos y cocolitos	25
Estructura celular	28
Ciclo de vida.....	31
Morfología de los cocolitos	32
Cristalización de la calcita.....	37
La calcita de los cocolitos	38
La polarización de la luz	45
Polarización lineal, circular y elíptica.....	45
Propagación de la luz por un material birrefringente	48
Bibliografía	52
Capítulo II: Metodología	57
Microscopio	57
Microscopio polarizador (lineal).....	58
Microscopio polarizador (circular).....	62

Programa C-Calcita.....	65
Carga de una o múltiples imágenes	67
Eliminación del ruido	67
Calibración de las distancias vertical y horizontal.....	68
Calibración del espesor	69
Selección de zonas de interés	75
Mediciones.....	75
Perfiles	76
Imagen 3D	76
Medición de áreas, volúmenes y masa	77
Medición de flujo de carbonato debido a cocolitos.....	78
Automatismos.....	80
Bibliografía	83
Capítulo III: Observación de cocolitos con luz polarizada. Ventajas de la polarización	
circular.....	87
Introducción.....	87
Propagación de la luz dentro de los cocolitos	89
Ventajas y aplicaciones de la polarización circular	92
Bibliografía	102
Capítulo IV: Mediciones biométricas de cocolitos y comparación con técnicas anteriores	107
Introducción.....	107
Metodología.....	108
Resultados.....	112
Análisis y comparación con otras técnicas.....	113
Bibliografía	119
Capítulo V: Estimación del flujo de carbonato debido a cocolitos en la zona del Frente	
Polar del océano Austral.....	125
Introducción.....	125
Área de estudio.....	128
Material y Metodología	133
Resultados.....	140

Flujo de carbonato debido a cocolitos. Comparación con el carbonato total.....	140
Flujo de carbonato debido a cocolitos. Comparación con la técnica de Young y Ziveri (2000).....	142
Análisis e interpretación ecológica y oceanográfica.....	150
Conclusiones.....	164
Bibliografía.....	165
Capítulo VI: Variaciones de espesor y masa de los cocolitos de <i>Emiliana huxleyi</i> en la zona del Frente Polar del océano Austral	173
Introducción.....	173
Metodología.....	176
Resultados y análisis	178
Estacionalidad.....	186
Diversidad de morfotipos	190
Conclusiones.....	192
Bibliografía.....	193
Capítulo VII: Conclusiones y líneas de investigación futuras	199
Conclusiones.....	199
Conclusions.....	203
Líneas de investigación futuras.....	204
Índice de figuras.....	207
Agradecimientos.....	213
Anexos.....	217
I. Artículo publicado en la revista Marine Micropaleontology.....	219
II. Artículo publicado en la revista Nature Communications.....	233
III. Registro de propiedad intelectual	249
IV. CD-ROM programa C-Calcita	255

Resumen

Los cocolitos son unas placas calcáreas secretadas por un grupo de algas unicelulares marinas llamadas cocolitóforos que constituyen uno de los principales componentes del fitoplacton oceánico. Juegan un papel esencial en el clima, principalmente por su importancia en el ciclo del carbono y también por ser emisores de agentes que actúan como núcleos en la formación de las gotas de agua que forman las nubes.

Presentes en los océanos desde el Triásico, los cocolitos preservados en registro sedimentario permiten realizar reconstrucciones paleoclimáticas, al reflejar las condiciones ambientales en las que vivieron los cocolitóforos que los formaron, así como procesos posteriores que afectaron al sedimento.

La forma más habitual de observar los cocolitos es mediante un microscopio óptico equipado con luz polarizada lineal, ya que al estar formados por un material altamente birrefringente como es la calcita, los cocolitos originan una figura de interferencia que destaca claramente en un fondo oscuro. Desde que en 1954 Kamptner afirmó que al observarlos con luz polarizada (lineal) los cocolitos de diferentes especies originan diferentes figuras, ésta ha sido la forma habitual de describir e identificar los diferentes tipos de cocolitos.

Pero la luz puede polarizarse de varias formas: además de lineal, existe la polarización elíptica y la circular. En la presente tesis se ha abordado el estudio de la luz polarizada circular y sus aplicaciones para el estudio de los nanofósiles calcáreos en general, y de los cocolitos en particular, a partir de sus características cristalográficas.

Entre las principales ventajas del uso de este tipo de polarización están:

1. Al observarlos con luz polarizada lineal los cocolitos con simetría radial presentan grandes diferencias en su intensidad, con zonas claras y oscuras alternándose, originando figuras con forma de cruz. Sin embargo, al utilizar luz polarizada circular, la intensidad de la figura en zonas con igual espesor es uniforme en aquellas unidades cristalinas que tienen la misma orientación de su eje cristalino, por lo que la figura obtenida se acerca mucho más a la forma real del cocolito, desapareciendo las zonas oscuras y facilitando la realización de medidas biométricas y la identificación automática.
2. Con luz polarizada circular la forma y brillo de los cocolitos es independiente del ángulo de rotación de la platina del microscopio, por lo que no es necesario rotarla para ver todos los cocolitos presentes en la muestra. Esto hace que una única imagen sirva para identificar y medir todos los cocolitos presentes.
3. La relación entre el color del cocolito y su espesor permite estimar su volumen a partir del estudio fotográfico de las muestras, lo que supone una forma rápida y sencilla de estimar el espesor y el volumen de los cocolitos. Además, si las muestras han sido preparadas obteniendo una distribución homogénea, permite el cálculo del flujo de calcita debido a cocolitos.

Tras exponer las principales ventajas del uso de luz polarizada circular se describe cómo un microscopio que utiliza luz polarizada lineal se puede adaptar fácilmente para el uso de luz polarizada circular, incorporando dos láminas retardantes de tipo $\lambda/4$.

Con el fin de realizar medidas en muestras reales de sedimentos se ha desarrollado un programa capaz de analizar las imágenes fotográficas capturadas por una cámara digital, realizando mediciones biométricas, tanto de áreas, longitudes, superficies y volúmenes de cocolitos individuales como de la cantidad de calcita presente en todo un campo visual, lo que ha permitido calcular el flujo de carbonato debido a cocolitos presente en una muestra.

Se ha trabajado con sedimentos recogidos en el Mediterráneo Occidental, en donde se han calculado los volúmenes individuales de varias especies de cocolitos, comparando los resultados con otras técnicas y detallando las ventajas que supone el uso de la luz polarizada circular. También se han analizado muestras recogidas en trampas de sedimentos en el océano Austral, en donde se ha estimado el flujo de carbonato debido a cocolitos y las variaciones en

el espesor de los correspondientes de la especie *Emiliana huxleyi*. Los resultados obtenidos son coherentes y suponen una mejora respecto a otras técnicas anteriores.

Entre las conclusiones principales destaca que el uso de luz polarizada circular permite la realización de medidas biométricas, en especial del volumen y espesor de cocolitos individuales, así como el cálculo del flujo total de carbonato debido a cocolitos presente en una muestra.

Abstract

Coccolithophore algae possess small calcareous plates called coccoliths that they secrete to form a cell covering. The most common method for observing and identifying calcareous nanofossils is using a transmitted light microscope equipped with crossed polarizers: the sample is illuminated with linearly polarized light and observed through a second linear polarizer, usually called the analyzer, orientated at 90° to the first polarizer. Isotropic materials appear dark, as do anisotropic materials viewed along an optical axis. Other anisotropic materials show interference colors depending on their shape, thickness and orientation.

Since Kamptner in 1954 demonstrated that coccoliths of different taxa show different extinction patterns, taxonomic identification has routinely made use of diagnostic extinction patterns. However, this traditional technique, using linearly polarized light, has some disadvantages. For example, when observed with linearly polarized light, coccoliths with a radial fabric and circular or elliptical shape show distinct extinction crosses, with some areas where the extinction of light is total, so they appear black, and others where brightness is at a maximum. Although these extinction crosses can be useful for identifying taxa, they can also be a disadvantage for some applications because the brightness depends not only on the thickness and shape, but also on the orientation of the coccolith with respect to the axes of the polarizers. Furthermore, for specimens formed of single crystal units, such as *Florisphaera profunda* nannoliths, the whole specimen is invisible at some angles, which means that the observer has to rotate the microscope stage in order to see them.

These disadvantages can be overcome if circularly polarized light is used instead of linearly polarized light. Furthermore, a method of estimating the mass of a single coccolith originally proposed by Beaufort (2005) using images taken with linearly polarized light can be improved if circularly polarized light is used.

A transmitted light microscope equipped with crossed polarizers can easily be modified to produce circularly polarized light instead of linearly polarized light by using two $\lambda/4$ retardation plates, placing one of them above the lower linear polarizer at an angle of 45° relative to it and the other one before the upper linear polarizer, also at 45° .

This technique has several advantages for observing coccoliths:

1. There is no extinction of nannolith at any orientation. One example is *F. profunda*. Because this species is formed of single crystals with optical axes in the plane of the lith, their brightness when they are observed with linearly polarized light depends on their orientation with respect to the axis of the analyzer, varying from almost zero to a maximum. Therefore, all the nannoliths in a field of view cannot be detected and measured in a single image taken with linearly polarized light. If circularly polarized light is used, all nannoliths such as *Florisphaera* can be detected and measured in one image, at any orientation of the stage.
2. The images of radial coccoliths do not have the pseudo-extinction crosses typical under cross polarized light. Their brightness and color depend only on their shape. This makes their appearance more consistent and aids significantly in observing central area structures and in determining if structures are axially aligned or slightly oblique.
3. The use of circularly polarized light, combined with oblique illumination, makes all coccoliths visible.

Circularly polarized light can be used instead of linearly polarized light for biometric studies and for species identification, but the most important application is the calculation of coccolith mass, to better estimate the amount of calcite produced by coccolithophores. If the samples have been prepared obtaining an homogeneous distribution, the calcite coccolith fluxes can also be estimated.

In this study it has been used a Nikon Eclipse LV100 POL polarized light microscope with a 100x H/N2 objective, two $\lambda/4$ plates and a Nikon DS-Fi1 Digital Camera. The images

were captured using Nis-Elements software, and processed with a customized program developed in Matlab, named C-Calcita. The sample slides were prepared using the decantation method of Flores and Sierro (1997), which creates a homogenous distribution and therefore allows calculations of the number of coccoliths per gram of sediment and coccoliths fluxes to be made.

The first chapter describes what are coccolithophores and calcareous nannofossil and emphasizes the importance of its study. Considering that coccolithophores are one-celled marine algae that surround themselves with microscopic plates made of calcite, here the optical properties of this mineral are described and what is polarized light and the different polarization states is also explained.

In the second chapter, the light microscope used in this research is described, depicting the required configuration to work with circular polarization and the features of the developed software (C-Calcita) as part of this PhD project. C-Calcita constitutes the basis for all the quantitative measurements performed which have been used in the next chapters.

The third chapter provides an overview of the transmission of light through coccoliths, detailing the benefits of using circularly polarized light instead of linearly polarized light.

Biometric measurements of coccoliths are shown in the fourth chapter; highlighting the accurate estimates of coccolith mass obtained for different coccolithophore species. These biometries are compared to results obtained using different techniques. The results from this chapter have been presented at the International Nannoplankton Association -INA- meeting 14 in Virginia, USA; INA 15 in Bohol, Philippines, and constituted the base for a paper recently published in the journal *Marine Micropaleontology*.

Due to the fact that another important application of the circularly polarized light is the estimation of (coccolithophore) calcite fluxes, the results from a sediment trap located at the Polar Front in the Southern Ocean are displayed in the fifth chapter. The total coccolith calcite flux has been calculated with a new technique, measuring directly the calcite from several images obtained under circularly polarized light. The temporal flux pattern reflected the variations in surface oceanographic conditions and primary productivity, which showed strong annual cycling.

In the sixth chapter is shown the coccolith size, mass and thickness measurements performed in specimens of *Emiliana huxleyi* coccoliths from the already mentioned SO sediment trap.

Finally, the main conclusions derived from this work and the suggested potential paths for future research are detailed in the last chapter.

Presentación y justificación

Las características físicas de los cristales de calcita han hecho que, durante décadas, la forma más habitual de observar y estudiar los cocolitos haya sido mediante la utilización de un microscopio óptico equipado con polarización lineal.

Pero la luz puede tener diferentes estados de polarización y, frente a la polarización lineal, el uso de polarización circular tiene ventajas y aplicaciones que, hasta ahora, no han sido aprovechadas el estudio de los cocolitos. Por ello es importante que los investigadores conozcan cómo un microscopio óptico que utilice luz polarizada lineal, presente de manera habitual en cualquier laboratorio que se dedique al estudio de los cocolitos, puede adaptarse fácilmente para utilizar luz polarizada circular, así como cuáles son sus ventajas y aplicaciones.

Objetivos

Los objetivos de la presente tesis son:

1. Establecer las ventajas del uso de luz polarizada circular para el estudio de los nanofósiles calcáreos.
2. Explicar cómo un microscopio óptico con polarización lineal puede modificarse para utilizar luz polarizada circular.
3. Elaborar un programa informático que permita realizar medidas cuantitativas de variables morfométricas y, en especial, del volumen y el espesor de cocolitos individuales, a partir de imágenes fotográficas capturadas con un microscopio equipado con polarización circular.
4. Realizar medidas con muestras reales que pongan de manifiesto las ventajas del uso de luz polarizada circular. En concreto:
 - Medición de cocolitos individuales.
 - Cálculo de flujo de calcita debido a cocolitos.

Estructura de la tesis doctoral

Se comienza con un primer capítulo en el que se describe brevemente qué son los cocolitos y porqué es importante su estudio, así como el de otros nanofósiles calcáreos. Se describen también las características ópticas del mineral que los forma, la calcita, para posteriormente exponer qué es la luz polarizada y cuáles son sus diferentes estados de polarización.

En el segundo capítulo se describe el microscopio utilizado, poniendo especial énfasis en la configuración necesaria para trabajar con luz polarizada circular, y las características de un programa informático desarrollado expresamente como parte del presente trabajo que ha servido para realizar las mediciones cuantitativas de los capítulos posteriores.

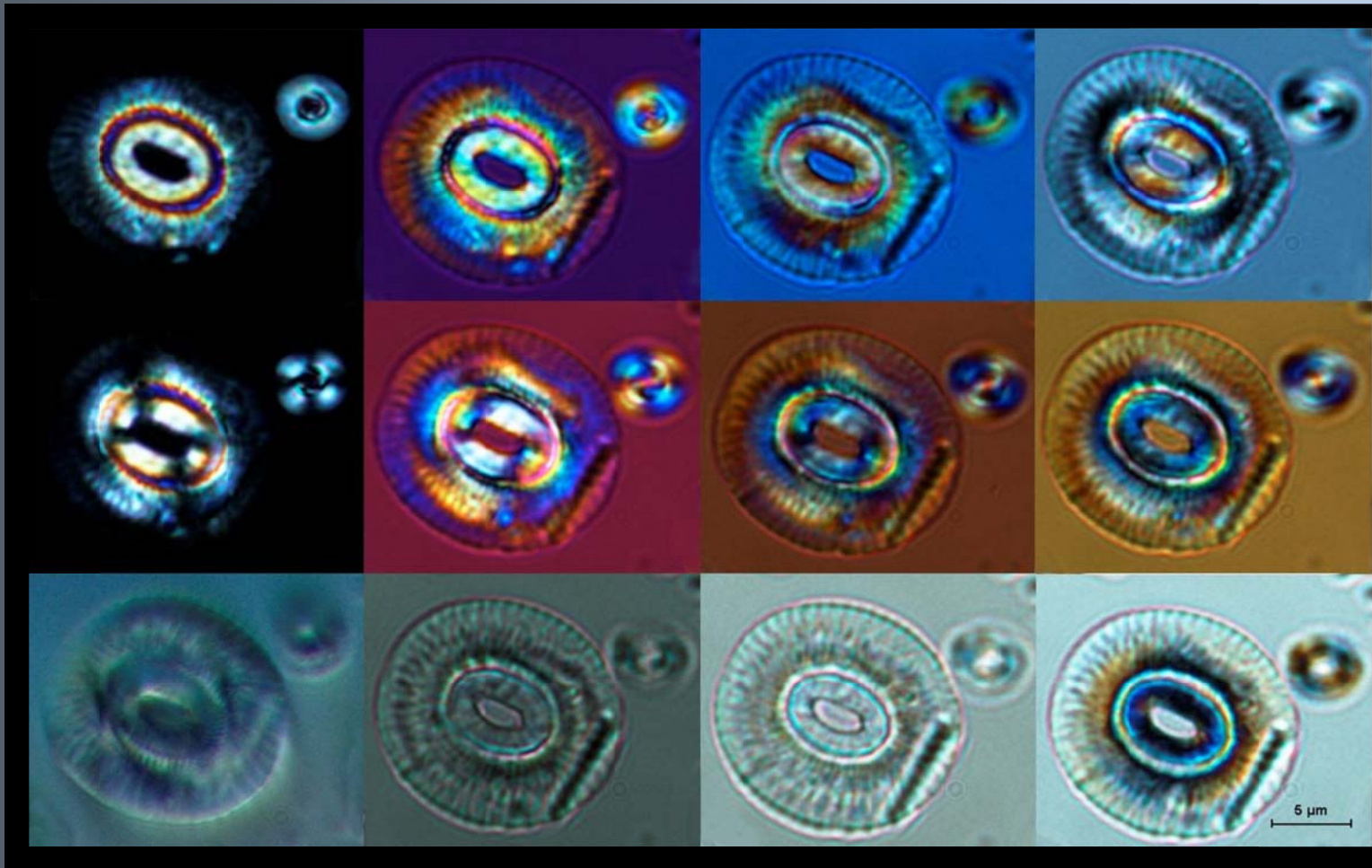
En el tercer capítulo se describe cómo se propaga la luz dentro de los cocolitos y qué ventajas y aplicaciones tiene el uso de luz polarizada circular.

En el cuarto capítulo se presentan las mediciones biométricas de cocolitos, entre las que destacan las medidas de masa de diferentes especies, y se comparan con los resultados obtenidos mediante otras técnicas. Los resultados de este capítulo, junto con una breve exposición de las ventajas de la polarización lineal, la configuración del microscopio y el programa desarrollado han sido publicados en la revista *Marine Micropaleontology*, en un artículo que se incluye como anexo.

Ya que otra de las principales aplicaciones de la polarización circular es el cálculo del flujo de calcita debido únicamente a cocolitos, en el quinto capítulo se presentan los resultados obtenidos del análisis de trampas de sedimentos localizadas en el Frente Polar del océano Austral.

En el capítulo sexto presentan los datos obtenidos al medir tamaños, masas y espesores de cocolitos de la especie *Emiliana huxleyi* en las muestras analizadas en el capítulo anterior.

Por último, el capítulo séptimo recoge las principales conclusiones de la presente tesis y las posibles líneas de investigación futura.



Capítulo I

Cocolitos y luz polarizada

Capítulo I: Cocolitos y luz polarizada

Cocolitos

Cocolitóforos y cocolitos

Los cocolitóforos son un grupo de organismos marinos unicelulares de nutrición autótrofa. Están clasificados dentro del filo Haptophyta y la clase Prymnesiophyceae (Hibberd, 1976) y se caracterizan por la generación, durante una parte de su ciclo vital, de una serie de placas calcáreas llamadas cocolitos. El conjunto de cocolitos forma una cubierta calcificada llamada cocsfera.

La necesidad de luz para realizar la fotosíntesis hace que los cocolitóforos habiten en la parte superior de la columna de agua, constituyendo uno de los componentes mayoritarios del fitoplancton marino y formando hasta el 10 % de su biomasa total (Tyrrell et al., 2009). La mayoría de las especies habita en la zona fótica superior (aproximadamente los primeros 50 metros), aunque algunas especies se han especializado en el uso de luz con longitudes de onda menor, que penetra más en la columna de agua, y son capaces de vivir en las zonas fóticas media e inferior, alcanzando los 200 metros de profundidad, como es el caso de la especie *Florisphaera profunda*.

Las diferentes especies de cocolitóforos se han adaptado a vivir en condiciones de temperatura que van desde las aguas tropicales a las polares y su abundancia puede ser tan alta que pueden llegar hasta los 10 millones de especímenes por litro, dando lugar a grandes eclosiones que pueden ser detectadas por imágenes de satélite.

Además de por el interés ecológico que desempeñan los cocolitóforos al estar en la base de la cadena trófica como productores primarios, tienen gran importancia en la climatología terrestre:

- Los cocolitóforos absorben grandes cantidades de dióxido de carbono atmosférico que transforman en materia orgánica mediante la fotosíntesis, en un proceso denominado “bomba de carbono orgánico” si bien sólo una pequeña parte de esta materia orgánica se preserva en el sedimento por lo que gran parte del carbono vuelve a aflorar por fenómenos de “upwelling”.
- Por otra parte, la formación de los cocolitos y su transporte y sedimentación en el fondo oceánico actúa como sumidero del CO₂ atmosférico (Honjo, 1976). Su abundancia es tal que forman la mayor parte de los sedimentos oceánicos (se ha estimado que el 60% del carbonato cálcico oceánico es debido a cocolitos).
- La atmósfera y las masas superficiales del océano intercambian continuamente dióxido de carbono, de tal manera que las variaciones en la presión parcial del CO₂ afectan al sistema de carbonato oceánico: así, el aumento o disminución de la $p\text{CO}_2$ atmosférica provoca variaciones en el PH que pueden llegar a causar la disolución del carbonato.
- Además, los cocolitóforos desprenden dimetilsulfuro, que actúa como núcleo para la formación de nubes (Keller, 1989; Malin y Erst, 1997).

En el registro fósil, los cocolitos y todas las estructuras equivalentes a ellos se engloban dentro de los nanofósiles calcáreos o nanolitos, que son todos aquellos fósiles formados por carbonato cálcico que tienen un tamaño menor de 30 μm .

Los cocolitos conservados en los sedimentos son indicadores estratigráficos de gran importancia (Lloyd et al., 2011) y permiten la reconstrucción climática y oceanográfica del ambiente en el que vivieron, gracias a que las asociaciones de cocolitos y sus características individuales dependen de las condiciones en las que vivieron los cocolitóforos que los formaron. Por ello a partir de sus características se pueden realizar estimaciones de parámetros como la temperatura, salinidad o nutrientes, variaciones en el PH o procesos de disolución.

Su sistemática ha sido la establecida a partir de la clasificación propuesta por Young y Bown en 1997, posteriormente revisada por Young et al., 2003:

División HAPTOPHYTA

Clase PRYMNESIOPHYCEAE

Orden COCCOLITHALES

Familia CALCIDISCACEAE

Género *Calcidiscus*

Especie *Calcidiscus leptoporus*

Género *Oolithotus*

Especie *Oolithotus fragilis*

Especie *Oolithotus antillarum*

Género *Umbilicosphaera*

Especie *Umbilicosphaera sibogae*

Especie *Umbilicosphaera foliosa*

Familia COCCOLITHACEAE

Género *Coccolithus*

Especie *Coccolithus pelagicus*

Orden ISOCHRYSIDALES

Familia NOELAERHABDACEAE

Género *Emiliana*

Especie *Emiliana huxleyi*

Género *Gephyrocapsa*

Especie *Gephyrocapsa caribbeanica*

Especie *Gephyrocapsa muelleriae*

Especie *Gephyrocapsa oceanica*

Grupo "small" *Gephyrocapsa*

Orden SYRACOSPHAERALES

Familia SYRACOSPHAERACEAE

Género *Syracosphaera*

Especie *Syracosphaera pulchra*

Familia CALCIOSOLENIACEAE

Género *Calciosolenia*

Especie *Calciosolenia murrayi*

Familia RHABDOSPHAERACEAE

Género *Rhabdosphaera*

Especie *Rhabdosphaera clavigera*

Orden ZYGODISCALES

Familia HELICOSPHAERACEAE

Género *Helicosphaera*

Especie *Helicosphaera carteri*

Familia PONTOSPHAERACEAE

Género *Pontosphaera*

Especie *Pontosphaera multipora*

Especie *Pontosphaera japonica*

Grupo de Nanolitos

Familia CERATOLITHACEAE

Género *Ceratolithus*

Especie *Ceratolithus cristatus*

Género *Neosphaera*

Especie *Neosphaera coccolithomorpha*

Familia UMBELLOSPHAERACEAE

Género *Umbellosphaera*

Especie *Umbellosphaera irregularis*

Especie *Umbellosphaera tenuis*

Grupo de Nanolitos “incertae sedis”

Género *Florisphaera*

Especie *Florisphaera profunda*

Estructura celular

Los cocolitóforos pertenecen al filo Haptophyta por la presencia de haptonema, que es un órgano compuesto por varios microtubos, si bien en algunos grupos aparece de forma vestigial. Junto con los flagelos, el haptonema forma el aparato flagelar, cuya función podría estar relacionada con la captura de partículas o ser un orgánulo táctil y sensorial. El aparato flagelar es considerado una característica evolutiva con importancia filogenética (Pienaar, 1994).

Los cocolitóforos están formados por el protoplasma, en el que se encuentran todos los orgánulos internos de la célula, y una cubierta celular llamada periplasto. El periplasto es

una pared celular formada por una o varias capas de pequeñas escamas de composición orgánica o inorgánica, sintetizadas por el aparato de Golgi (Kiermayer y Romanovicz, 1981; Billard y Inouye, 2004). Las escamas orgánicas son pequeñas y finas, apareciendo después del protoplasma, mientras que las de composición inorgánica son más grandes y robustas. Estas últimas son los cocolitos, que se imbrican entre sí formando la cocosfera. Por tanto, la formación del cocolito comienza en el aparato de Golgi (Pienaar, 1994) y cuando el cocolito ha completado su calcificación es expulsado a la superficie celular.

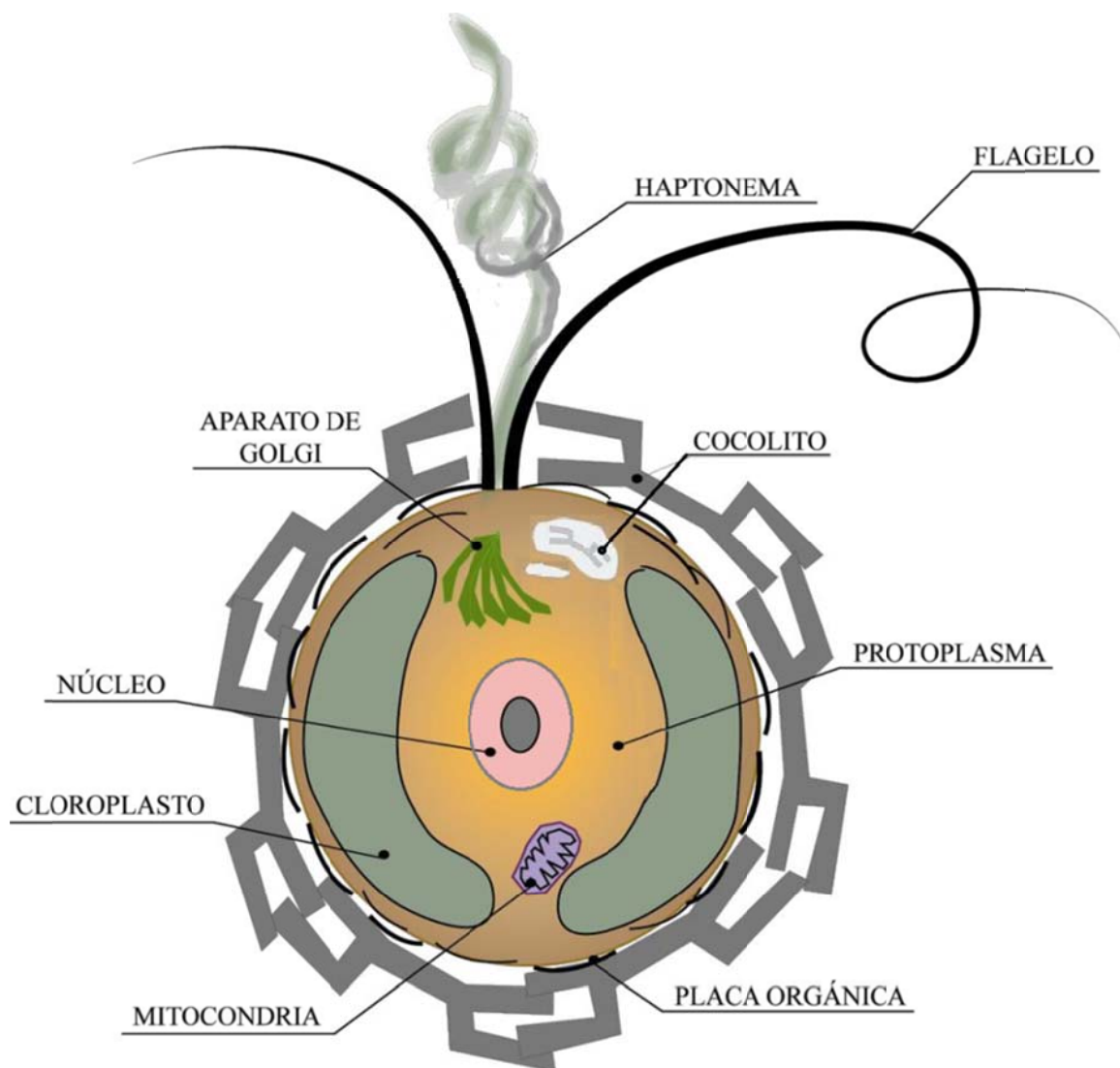


Fig. 1.1 Estructura de una célula cocolitófora. Modificado de Young y Henriksen (2003).

La función de los cocolitos aún es desconocida. Las hipótesis más extendidas son (Young, 1994; Flores y Sierro, 2007):

- Protección ante depredadores, virus y bacterias: algunas estructuras espinosas podrían reducir la depredación, mientras que la cobertura completa de cocolitos podría proteger de ataques bacterianos o virales.
- Control de la flotabilidad: La presencia de cocolitos puede variar la densidad de la célula haciendo que el cocolitóforo se mantenga en una zona determinada, ascienda o descienda, a la vez que las cocsferas no esféricas podrían controlar su dinámica dependiendo de su orientación.
- Control de la luz incidente o reflejada: los cocolitos podrían servir para reflejar rayos ultravioleta nocivos, o actuar como lentes para focalizar la luz en los cloroplastos. Esta función ha sido recientemente estudiada por Mizukawa et al., 2015, demostrado que la orientación de los cocolitos respecto a la dirección de la luz incidente puede condicionar la cantidad de luz que entra en la célula.
- Regulación de procesos bioquímicos: procesos como la calcificación pueden mejorar la eficiencia bioquímica de la célula.

Ciclo de vida

De manera general, el ciclo de vida de los cocolitóforos es heteromórfico, alternando una fase haploide con otra diploide. En la fase haploide las células contienen una sola copia de cada cromosoma, mientras que en la diploide contienen dos. La transición de la fase haploide a la diploide se produce por singamia: dos células aploides se combinan para dar una diploide, mientras que la transición de la fase diploide a la haploide se produce por meiosis, dando lugar a cuatro células hijas haploides (Flores y Sierro, 2007). En la mayoría de los cultivos, la reproducción se produce por mitosis, y las nuevas células comparten los cocolitos generados previamente por la generación anterior.

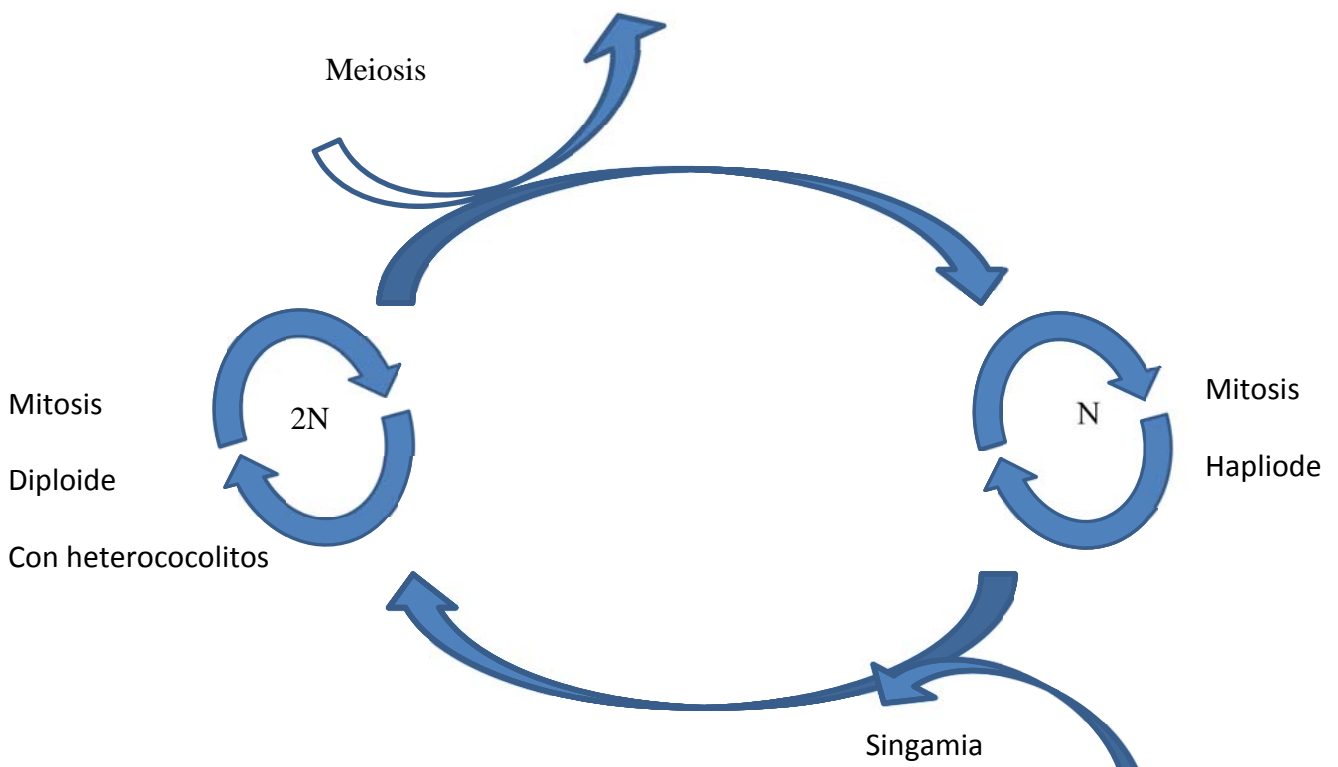


Fig. 1.2 Ciclo de vida de los cocolitóforos.

Morfología de los cocolitos

La morfología de cada cocolito es característica de cada especie de cocolitofórido, por lo que las características de los cocolitos se utilizan como criterio principal para su identificación y clasificación.

Según su morfología se pueden clasificar en:

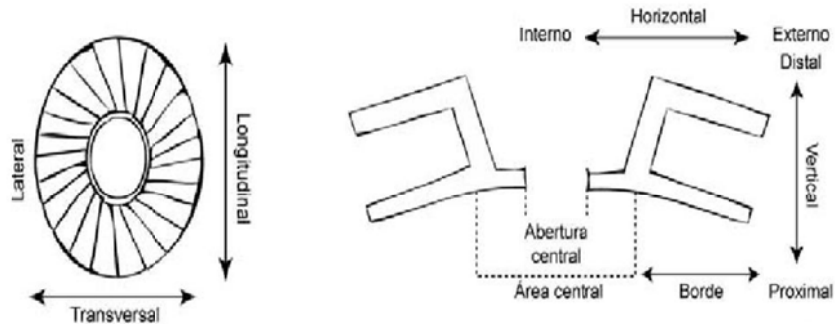
Heterococolitos:

Son cocolitos en los que los distintos cristales de calcita se disponen radial y verticalmente, formando un cocolito aproximadamente ovalado que consta de un borde y de un área central, que puede estar vacía o contener otras estructuras (Young y Henriksen, 2003; Flores y Sierro, 2007). Se forman dentro de la célula durante su fase diploide (Westbroek et al., 1989; Pienaar, 1994). Existen tres tipos de heterococolitos, dependiendo de las unidades cristalinas que los forman: murolitos, placolitos y nanolitos (fig. 1.3)

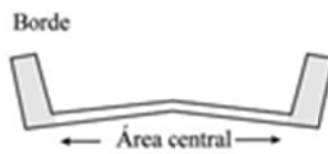
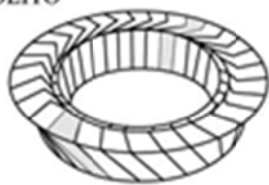
- Murolitos: Tienen forma de cuenco y presentan un área central rodeada de un borde o pared exterior perpendicular.
- Placolitos: Tienen forma de disco y un borde formado por dos escudos (distal y proximal) separados por un tubo.
- Planolito: Tienen forma de disco formado por un único escudo de tal manera que el borde y la zona central quedan en el mismo plano.

TIPOS DE HETEROCOCOLITOS

HETEROCOCOLITO



MUROLITO



PLACOLITO



PLANOLITO

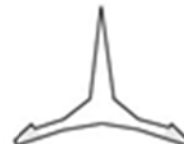
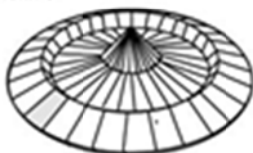


Fig. 1.3 Tipos de heterococolitos y nomenclatura empleada. Adaptada y modificada de <http://ina.tmsoc.org/terminology/3coccoliths.htm>.

Holococolitos

Son cocolitos formados por numerosos cristales de calcita, pequeños e idénticos unos a otros, si bien entre especies muestran un alto grado de diversidad. (Young y Henriksen, 2003; Flores y Siervo, 2007) (Figura 1.4.). Su formación tiene lugar durante la fase aloploide, probablemente de forma extracelular (Rowson et al., 1986). Los pequeños cristales que forman los holococolitos se disgregan rápidamente, lo que dificulta su observación y su preservación en el registro sedimentario (Winter y Siesser, 1994).



Fig. 1.4 Diferentes holococolitos. La fotografía de la derecha muestra una cocosfea con holococolitos y heterococolitos.

Fuente: <http://ina.tmsoc.org/Nannotax3/index.php?dir=Coccolithophores/Holococcoliths>

Nanolitos

En este grupo se incluyen todas aquellas estructuras calcáreas que difieren de las anteriores, incluyendo algunas que podrían no estar ligadas a los cocolitos. Se trata en general de estructuras cristalinas simples (Young y Henriksen, 2003; Flores y Sierro, 2007). Como ejemplos, se encuentran los cocolitos de los géneros *Florisphaera*, *Braarudosphaera* y *Ceratolithus* (Young y Bown, 1997; Bown y Young, 1998).

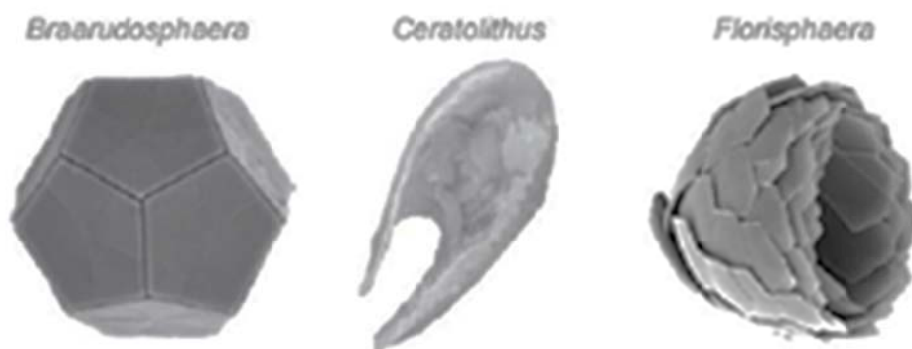


Fig. 1.5 Tipos de nanolitos.

Fuente: <http://ina.tmsoc.org/Nannotax3/index.php?dir=Coccolithophores>.

Estas estructuras ayudan a diferenciar las diferentes especies de cocolitóforos, si bien algunas especies presentan también menores variaciones morfológicas llamadas morfotipos. En el caso de la especie de cocolitóforo actual más extendida, que es *Emiliana huxleyi*, existen varios morfotipos y variedades relacionados con el tamaño y grado de calcificación de sus cocolitos (figura 1.6) (Young et al., 2003, Patil et al., 2014):

Morfotipo A: Cocolitos de tamaño medio (escudo distal de una longitud de entre 3 y 4 μm) bien calcificados y con elementos de área central curvados.

Morfotipo B: Cocolitos mayores, de una longitud promedio de entre 3,5 a 5 μm . Su zona central, del escudo distal es más delicada, con tubos irregulares, más finos y delicados. A menudo el escudo proximal es más ancho que el distal.

(Morfo)tipo C: Cocolitos de menor tamaño (2,5 – 3,5 μm), con elementos del escudo distal delicados y área central abierta o cubierta por una fina placa.

(Morfo)tipo B/C: Cocolitos de tamaño medio (3 - 4 μm) con elementos del escudo distal delicados, morfológicamente similares a los tipos B y C, pero de tamaño intermedio.

(Morfo)tipo R: De forma similar a los de tipo A, pero con elementos del escudo fuertemente calcificados.

Variedad Corona: presentan una estructura similar a una corona en su área central.

Variedad D: Con elementos irregulares en forma de T.

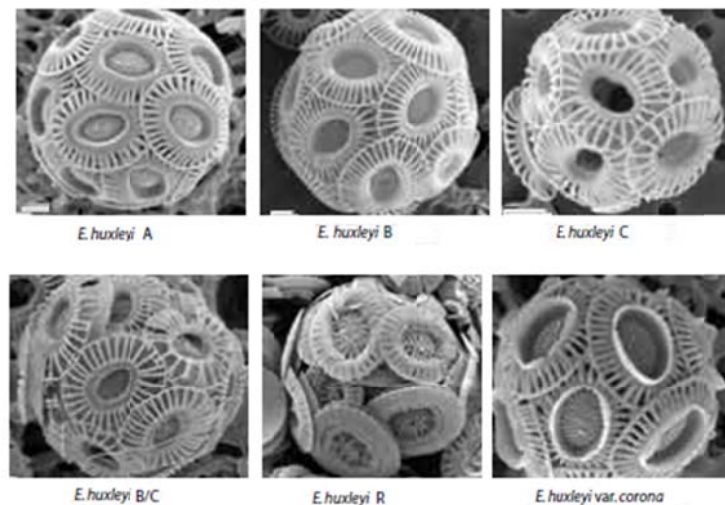


Fig. 1.6 Diferentes morfotipos de *Emiliana huxleyi*. Modificado de Young et al., 2003

Formación de los cocolitos

La formación de los cocolitos está controlada por procesos celulares. A lo largo del ciclo de vida del coccolitóforo existen dos tipos diferentes de fases, haploide y diploide. Cada una de ellas lleva asociados diversos procesos de biomineralización que originan diferentes estructuras. Tanto la fase haploide como la diploide se pueden reproducir indefinidamente, y no existe una fase dominante, como ocurre en otras especies. Ambas fases pueden producir estructuras calcáreas, la diploide produciendo heterococolitos y la haploide produciendo holococolitos.

Los heterococolitos producidos en la fase diploide son relativamente mucho mayores que los holococolitos producidos en la fase haploide, en la que cada célula se recubre con cientos o incluso miles de pequeños cristales de calcita (Young y Henriksen, 2003). La diferencia entre los holococolitos y los heterococolitos es tan grande que en muchos casos fueron descritos como pertenecientes a especies diferentes.

Existen algunas especies, como las pertenecientes al género *Emiliana* que solamente calcifican en la fase haploide, aunque los casos estudiados hacen pensar que los heterococolitos se forman en células diploides y los holococolitos en células haploides.

La formación y crecimiento de los cocolitos ocurre en vesículas formadas a su vez en el aparato de Golgi. El proceso comienza con la formación de una escama orgánica, lo que es común en otras especies de haptophytas, no solamente en los coccolitóforos. La cristalización del carbonato ocurre alrededor de la escama, formándose un protococolito con forma de anillo que crece hacia arriba y hacia afuera, formando el cocolito. Durante su formación, la vesícula también se va expandiendo mientras el cocolito crece. Cuando el cocolito está formado es expulsado fuera de la célula (exocitosis) al fusionarse la membrana de la vesícula con la membrana celular. Las moléculas orgánicas sobre las que cristaliza el cocolito son complejos de ácidos polisacáridos que actúan como vectores de los iones de calcio durante el proceso de mineralización, lo que originará posteriormente quiralidad en los cristales.

Cristalización de la calcita

Los carbonatos poseen un radical discreto $(\text{CO}_3)^{2-}$ que se puede considerar un anión, formado por una estructura triangular plana, con el átomo de carbono en el centro de un triángulo equilátero con un oxígeno en cada vértice. En el carbonato cálcico el átomo de Calcio actúa como catión.

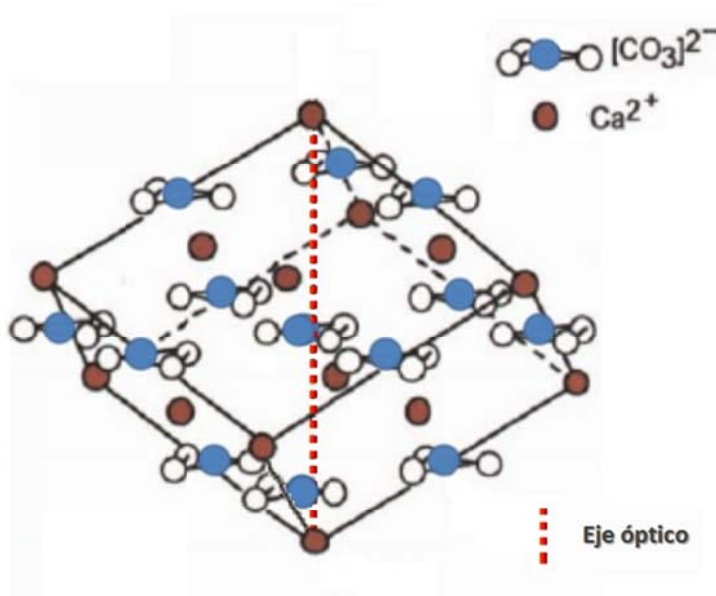


Fig. 1.7 Estructura atómica de un cristal de calcita.

Dependiendo de las condiciones de presión y temperatura, el CaCO_3 origina diversos minerales: la calcita, que cristaliza en el sistema trigonal (uniaxial), el aragonito, que cristaliza en el ortorrómbico (biaxial) y la vaterita que cristaliza en el hexagonal. El aragonito es una forma polimorfa de CaCO_3 que habitualmente se forma a mayores presiones que la calcita e incluso puede sufrir procesos de recristalización y transformarse en calcita. Si bien invertebrados como la mayoría de los moluscos producen estructuras de aragonito, éste se

suele convertir en calcita por procesos de diagénesis. De igual forma, la vaterita suele también convertirse en aragonito o calcita.

La calcita de los cocolitos

En los años sesenta algunos estudios afirmaron haber encontrado trazas de vaterita y aragonito al analizar la composición química de los cocolitos. (Wilbur y Watabe, 1963). Pero análisis posteriores no pudieron corroborar esos resultados, concluyendo que los cocolitos están formados únicamente por calcita (Young et al., 1991).

La forma de los cristales de calcita en el cocolito es muy distinta de la que tiene la calcita de origen inorgánico. La morfología es una interacción entre las direcciones de cristalización del mineral de calcita y las características bioquímicas y morfológicas de la vesícula celular que lo genera.

La orientación precisa de la red cristalina de los diversos cristales de calcita ha sido estudiada para algunas especies de cocolitos. La mayoría de los cocolitos están formados por varias unidades cristalinas, visibles al microscopio electrónico, que condicionan la visibilidad del cocolito al observarlo con luz polarizada.

Los cocolitos están formados principalmente por dos tipos de unidades cristalinas (figura 1.8):

Unidades tipo R: cristales en los que el eje óptico principal de la calcita se extiende radialmente, desde el centro del cocolito hacia el exterior.

Unidades tipo V: Cristales en los que el eje óptico principal de la calcita se extiende verticalmente.

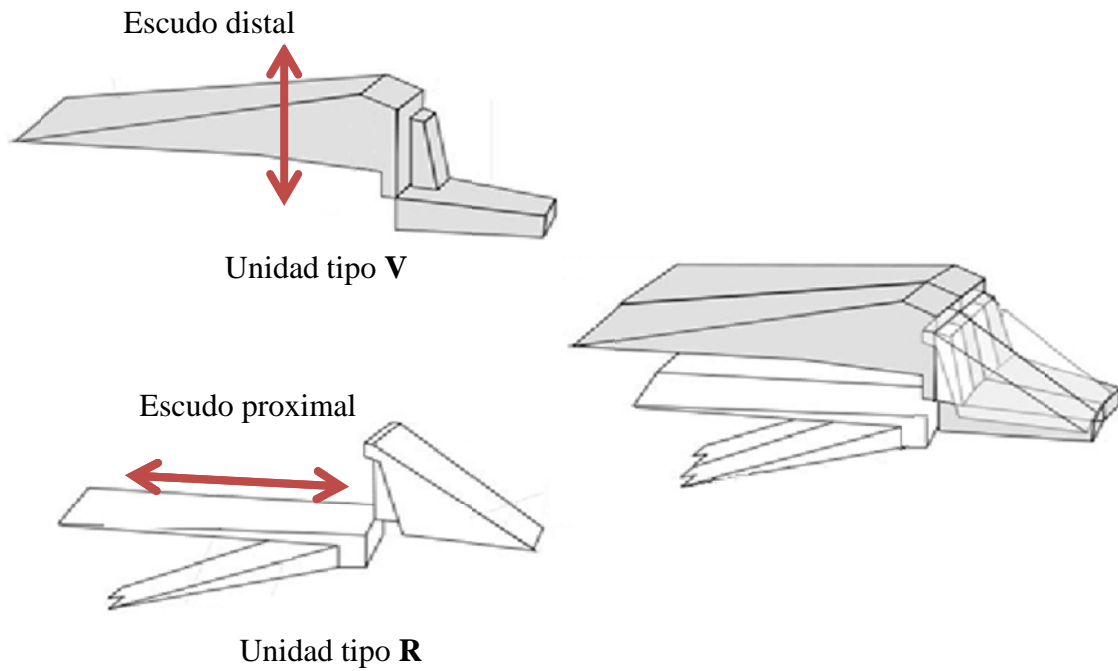


Fig. 1.8 Orientación del eje óptico (línea roja) en las unidades cristalinas tipo R y V. Modificado de Young y Henriksen (2003).

El anillo protococolito, a partir del cual se genera el resto del cocolito (figura 1.9), está formado por cristales simples de calcita con orientaciones R y V alternas. A partir de él se desarrolla el resto del cocolito. Mientras que los cocolitos de algunas especies están formados únicamente por unidades R o por unidades V, en otras están formados por los dos tipos, siendo algunas partes del cocolito unidades cristalinas de tipo R y otras de tipo V.

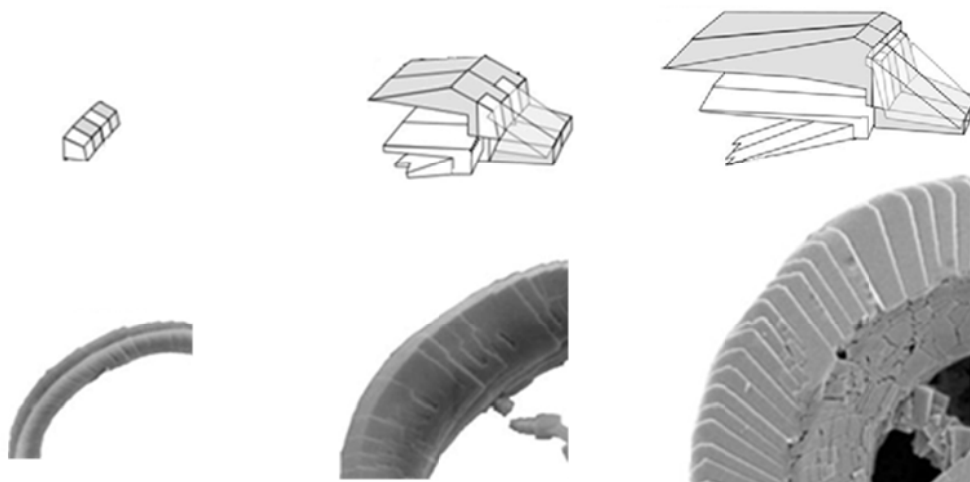
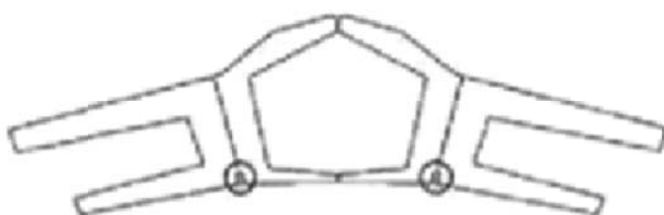


Fig. 1.9 Crecimiento del cocolito a partir del anillo protococolítico, con la unidades cristalina tipo R (blancas) y V (grises). Modificado de Young y Henriksen (2003).

El modelo de unidades V y R explica la posición del eje cristalino en las distintas especies de heterococolitos. Ha sido estudiado principalmente por Young y Henriksen (2003), dentro del proyecto CODENET para varias especies representativas, de tal forma que sus resultados se puedan extrapolar para especies similares. El análisis de imágenes de alta resolución tomado mediante microscopía electrónica (SEM) y de fuerza atómica (AFM) ha puesto de manifiesto que la mayoría de las superficies de los cocolitos tienen formas debidas a un origen biológico, y que aparentemente no siguen los planos cristalográficos (aunque a nivel atómico así sea), o bien pequeños cristales romboédricos de caras paralelas, característicos de los cristales de calcita.

La estructura para las principales especies de cocolitos es:

(Esquemas modificados de Young y Henriksen (2003), los círculos representan la posición inicial del anillo protococolítico)

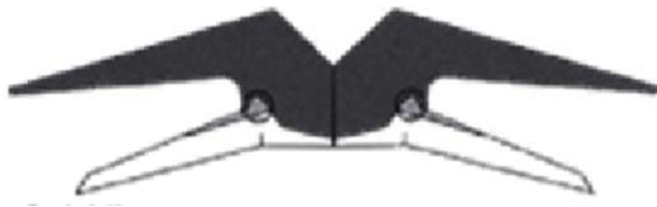


Los cocolitos de *Gephyrocapsa* tienen una estructura similar a los de *Emiliana huxleyi*, y en general similar a todo los de la familia Noelaerhabdaceae. Si bien su

desarrollo comienza con un anillo protococolítico de unidades V y R alternas, únicamente las unidades R se desarrollan, por lo que prácticamente todo el cocolito está formado por unidades de tipo R.



En el caso de los cocolitos de la especie *Coccolithus pelagicus*, tanto las unidades V como las R están bien definidas y desarrolladas. El escudo distal está formado por unidades V, que también forman la capa inferior del área central. Las unidades R forman el escudo proximal, mientras que las unidades V y R se forman a partir del anillo protococolítico. *C. pelagicus* también tiene una barra central formada por unidades R que se forma por nucleación separada.



Calcidiscus leptoporus tiene una estructura similar a *C. pelagicus*, con el escudo distal formado por unidades V y el proximal por unidades R. Sin embargo, la parte superior del área central está formada por unidades V y la inferior por R.

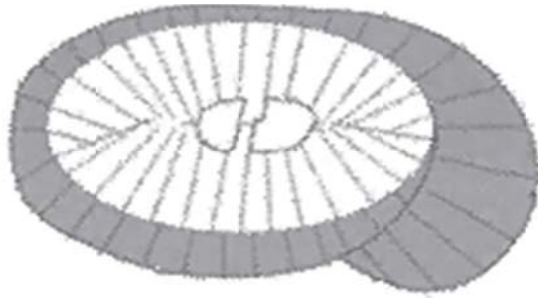


Umbilicosphaera foliosa, tiene una estructura similar a la de *Calcidiscus*.



En los cocolitos de *Helicosphaera* spp., mientras que el borde está formado de unidades V, la placa proximal y

la capa distal están formadas por unidades R.



Además de los anillos que siguen el modelo de unidades R o V, algunos heterococolitos tienen cristales en su área central que no lo siguen, como es el caso de los pertenecientes a las familias *Syracosphaeraceae* y *Rhabdosphaeraceae*:



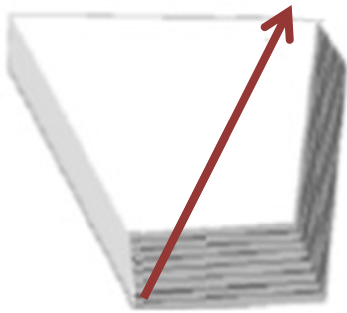
En el caso de *Syracosphaera pulchra*, el anillo exterior está formado por unidades R y V, mientras que la parte interior está formada por

cristales con sus ejes ópticos tangenciales al plano formado por el anillo exterior (señaladas en azul).

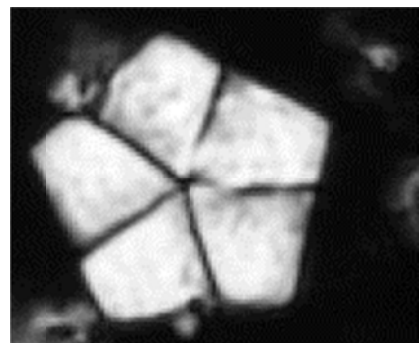
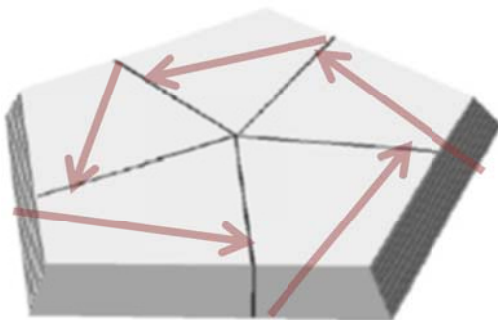
El modelo de unidades cristalinas V y R no puede ser aplicado a nanolitos como los correspondientes a las especies *Florisphaera*, *Braarudosphaera* o *Discoaster*.

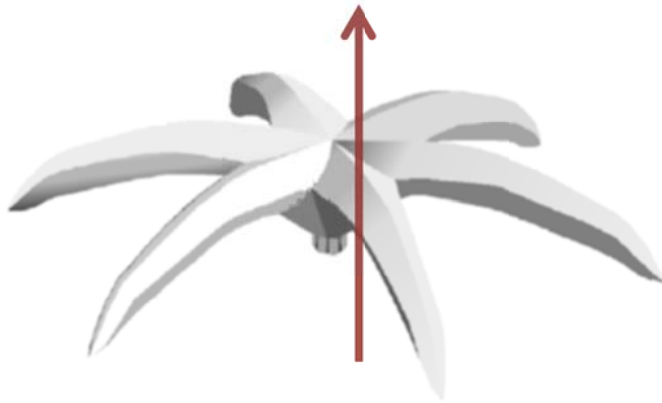


En el caso de nanolitos como los de *Florisphaera profunda*, el eje cristalino es paralelo a la dirección longitudinal.



La cocosfera de *Braarudosphaera* spp. Está formada por doce cocolitos con forma pentagonal, por lo que reciben el nombre de pentálicos. Cada uno de estos pentálicos está formado por cinco fragmentos trapezoidales. El eje cristalino recorre oblicuamente cada uno de estos fragmentos.





En el caso de *Discoaster* spp, sus nanolitos están formados por una estructura central de la que salen varios brazos radialmente. El eje cristalino sería perpendicular a los brazos, con la misma dirección que la de la estructura central.

La polarización de la luz

Polarización lineal, circular y elíptica

Siguiendo la teoría ondulatoria, la luz visible es un tipo de radiación electromagnética cuya longitud de onda está comprendida entre los 400 y los 700 nanómetros.

La radiación electromagnética es una onda transversal formada por un campo eléctrico y otro magnético, perpendiculares entre sí y que son, a su vez, perpendiculares a la dirección de propagación (figura 1.10).

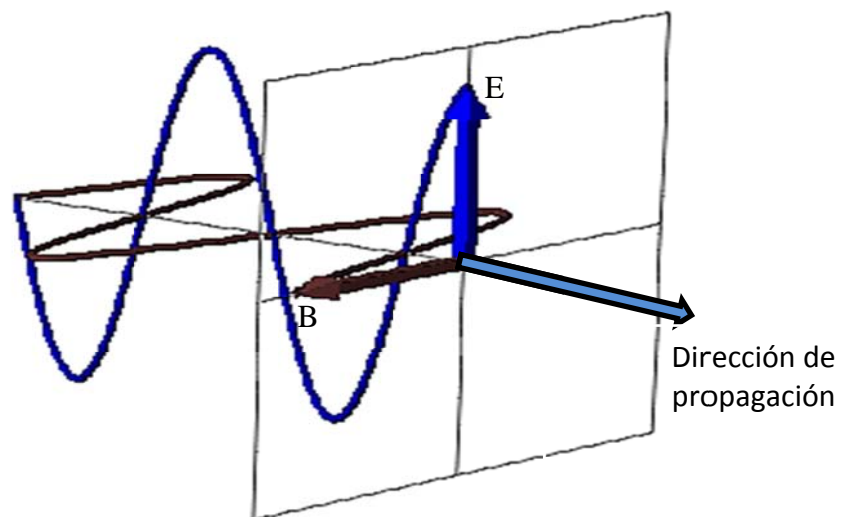


Fig. 1.10 Dirección de oscilación de los campos eléctrico (E) y magnético (B) comparados con la dirección de propagación de la luz.

Ya que tanto el campo eléctrico, E, como el campo magnético, B, son perpendiculares, a la hora de describir la luz se suele utilizar solamente uno de ellos, generalmente el eléctrico, E.

La luz visible se puede describir como compuesta por gran cantidad de ondas elementales de diferentes frecuencias. Habitualmente cada una de estas frecuencias tiene una orientación del campo eléctrico aleatoria, lo que hace que en la luz no haya una única orientación del campo eléctrico total. En ese caso se dice que el haz de luz no está polarizado.

Existen algunos materiales que tienen la propiedad de dejar pasar únicamente aquellos rayos en los que el campo eléctrico vibra en una dirección determinada. De esta manera, al incidir en ellos luz no polarizada, emerge luz polarizada lineal, es decir, luz en la que el campo eléctrico vibra siempre en la misma dirección. Existen varias formas de conseguir polarización lineal, entre las que destacan la absorción selectiva por dicroísmo, la reflexión por ángulo de Brewster o la polarización por dispersión.

Los cristales del sistema hexagonal y tetragonal dividen el rayo incidente en dos, por lo que se llaman birrefringentes, aunque tienen una única dirección a lo largo de la cual se comportan como si fueran isotrópicos. Esa dirección se llama eje óptico y por ello los cristales birrefringentes son también uniaxiales.

De esta manera, cuando un rayo de luz incide de forma perpendicular a la superficie de un cristal birrefringente, con una dirección distinta a la del eje óptico, se divide en dos rayos que viajan a través del cristal, cada uno de ellos con una velocidad diferente, por lo que ambos rayos se van desfasando uno respecto al otro.

El desfase de un rayo de luz respecto al otro se puede calcular como:

$$\varphi = \frac{2\pi}{\lambda}(n_e - n_o)d$$

Donde:

λ es la longitud de onda de la luz incidente.

n_e y n_o son, respectivamente, los índices de refracción ordinario y extraordinario, relacionados con las diferentes velocidades con las que la luz recorre cada una de las direcciones.

d es el espesor del material.

En el caso particular de que en un material birrefringente incida luz polarizada lineal, el vector campo eléctrico se puede descomponer en dos componentes que recorren el cristal con diferentes velocidades, lo que hace que a medida que recorre el cristal la luz va cambiando su estado de polarización. Si el desfase entre las dos componentes es de $\pi/2$ radianes, la polarización se vuelve circular, por el hecho de que el campo eléctrico resultante se mueve trazando círculos en la dirección de propagación (figura 1.11).

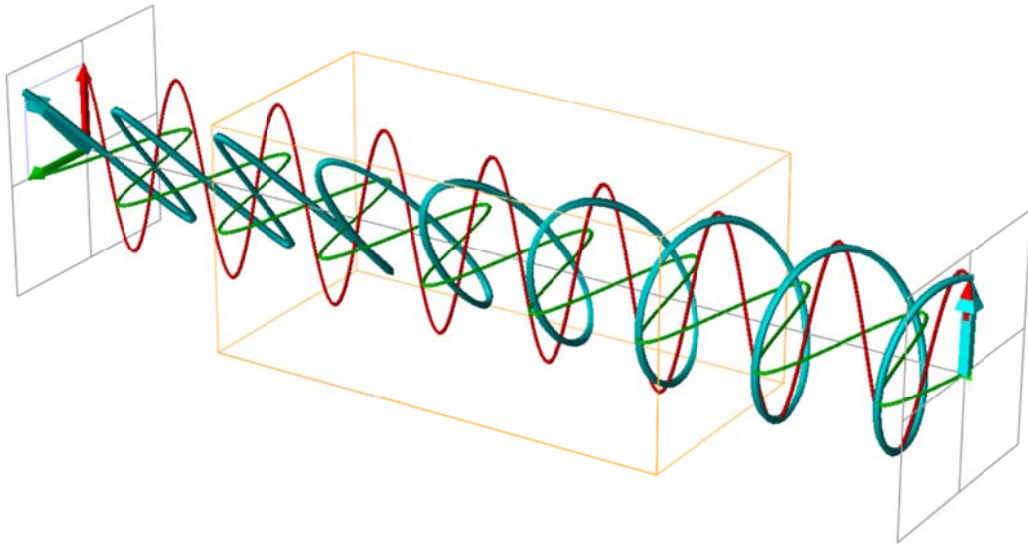


Fig. 1.11 Se muestra un haz de luz (azul) inicialmente polarizado linealmente que incide en un material birrefringente (paralelepípedo naranja). A medida que recorre el material, las componentes perpendiculares en las que se puede descomponer el campo eléctrico (verde y roja) se van desfasando, de tal manera que cuando abandona el material la luz está polarizada circularmente. Simulación realizada con el programa EMANIM.

Por tanto un material birrefringente con un espesor determinado podrá cambiar el estado de polarización de la luz de lineal a circular. Un material con estas características se denomina lámina $\lambda/4$.

Propagación de la luz por un material birrefringente

Los materiales amorfos como el vidrio, que no tienen una estructura atómica regular, y los cristales del sistema cúbico, como el cloruro de sodio, presentan refracción simple, por lo que tienen un único índice de refracción y un rayo de luz viaja a través de ellos a la misma velocidad, independientemente de la dirección. Se denominan isotrópicos.

Los minerales que forman cristales con dos direcciones de vibración (tetragonal y hexagonal) reciben el nombre de uniaxiales, mientras que los minerales con tres direcciones de vibración (ortorómbicos, monoclinicos y triclinicos) se llaman biaxiales. En ellos los rayos refractados de luz viajan en diferentes direcciones de vibración dentro del cristal.

Los carbonatos presentan altos valores de birrefringencia debido a que las estructuras triangulares planas que conforman los aniones se orientan paralelas al eje óptico, que discurre de forma oblicua atravesando diametralmente el cristal.

El comportamiento del rayo extraordinario depende de la dirección, de tal forma que en cada dirección se comportará según un valor de índice de refracción que variará entre el valor ordinario, n_o , y el extraordinario, n_e . La calcita es un cristal con birrefringencia negativa, lo que significa que el índice de refracción ordinario es mayor que el extraordinario. Esta variación espacial en los cristales uniaxiales se puede representar con una elipse de revolución, en la que los ejes corresponderán con los valores de los índices de refracción y que se conoce como indicatriz óptica (figura 1.12).

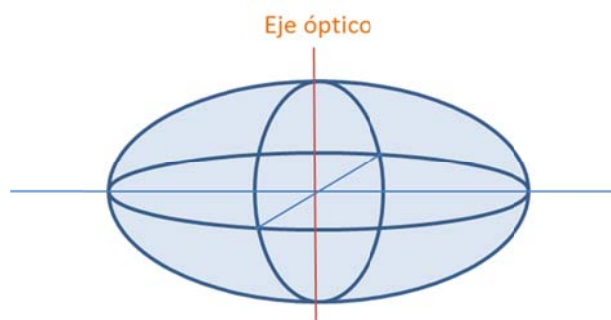
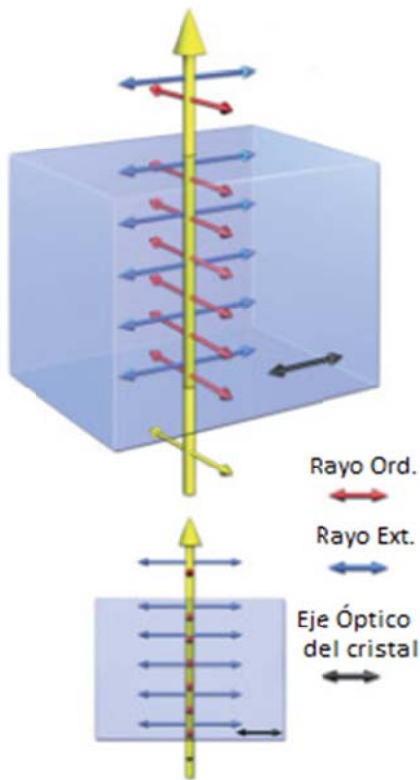


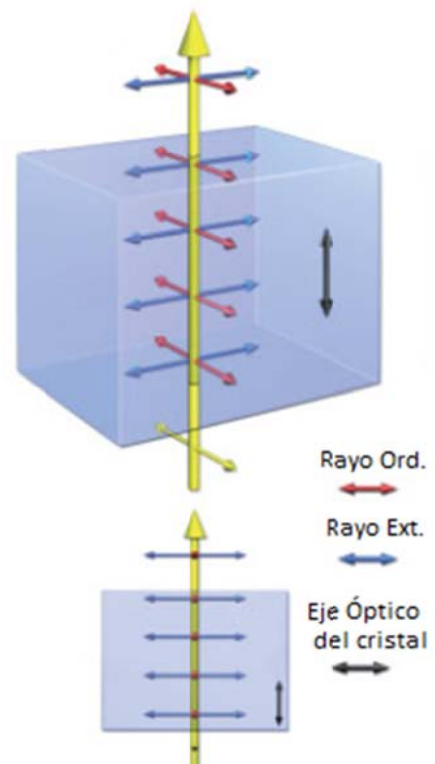
Fig. 1.12 Indicatriz óptica. Los ejes de la elipse representan los índices de refracción ordinario y extraordinario.

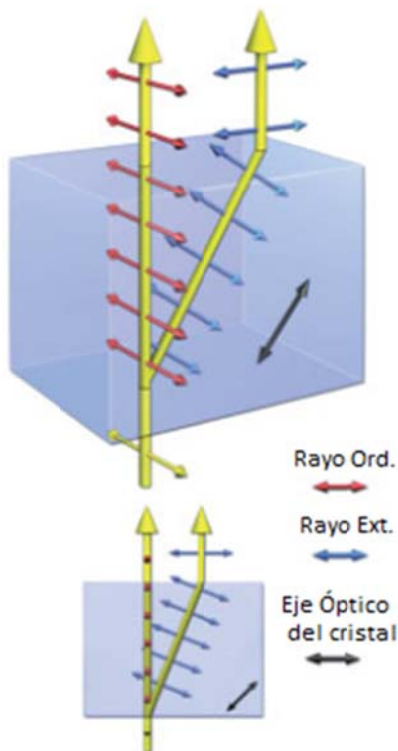
Cuando un rayo de luz alcanza perpendicularmente la superficie de un material birrefringente como la calcita, puede ocurrir que (imágenes modificadas de Douglas et al., 2012):



1.- Los rayos que inciden perpendiculares al eje óptico se separan en dos, ordinario y extraordinario, que viajan a diferentes velocidades y vibran en direcciones perpendiculares entre sí pero con sus trayectorias coincidentes. De esta forma, ambos rayos emergen del mismo punto del cristal polarizados en direcciones perpendiculares y con un desfase que depende del camino óptico recorrido (nd).

2.- Los rayos que inciden de forma paralela al eje óptico no se dividen en dos, sino que todos se comportan de igual forma, por lo que no hay rayo ordinario y extraordinario, comportándose como un material isotrópico.





3.- En el resto de direcciones, el rayo incidente se divide en dos, ordinario y extraordinario, desfasados y que recorren trayectorias diferentes dentro del cristal, emergiendo en puntos diferentes y polarizados perpendicularmente. En el caso de cristales muy pequeños, la separación lateral es tan poca que ambos rayos, que se han originado en el mismo punto del espécimen y son coherentes entre sí, están suficientemente cerca como para interferir uno con el otro al pasar por el analizador superior. (Waine, 2014)

Si el rayo de luz no incide de forma perpendicular a la superficie del cristal, sino formando un cierto ángulo, el rayo se divide en dos que recorren trayectorias diferentes, de manera similar al caso 3, pero el desfase entre el rayo ordinario y el extraordinario depende de varios factores (figura 1.13) y se puede calcular mediante la siguiente fórmula (Shribak and Olderboug, 2002):

$$\varphi = \frac{1 - (\text{sen} \gamma \text{ sen } \omega \cos(\phi - \theta) + \text{cos} \gamma \text{ cos } \omega)^2}{\text{sen}^2 \omega \text{ cos} \gamma} (n_o - n_e) t \text{ sen}^2 \omega$$

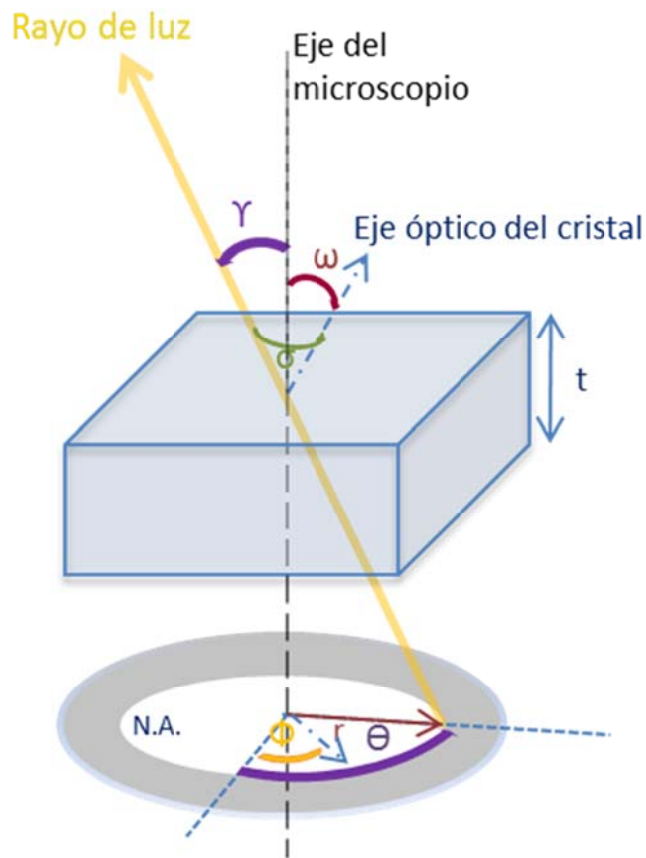


Fig. 1.13 Factores que influyen en la diferencia de fase entre el rayo ordinario y el extraordinario en el caso general. Figura modificada de Shribak y Olderborg, 2002.

Bibliografía

- Baumann, K.H., Andruleit, H., Boeckel, B., Geisen, M. y Kinkel, H., 2005. The significance of extant coccolithophores as indicators of ocean water masses, surface water temperature, and palaeoproductivity: a review. *Palaeontologische Zeitschrift* 79: 93-112.
- Born, M., Wolf, E., 1980, Principles of Optics. 6 ed. Elmsford, N.Y.: Pergamon Press.
- Bown, P., 1998, Calcareous nannofossil biostratigraphy. Chapman and Hall, London.
- Delly, J.G., 2008, Essentials of Polarized Light Microscopy, College of Microscopy.
- Douglas, B. M. y Davidson, M. W., 2012. Fundamentals of Light Microscopy and Electronic Imaging, 2nd Edition. Wiley-Blackwell.
- Flores, J.A. y Sierro, F. J., 2007. Paleoceanography, biological proxies: Coccoliths. En: Scott EA (ed) *Encyclopedia of Quaternary Science*. Amsterdam: Elsevier, 1634-1647.
- Honjo, S., 1976. Coccoliths: Production, transportation and sedimentation. *Marine Micropaleontology* 1: 65-79.
- Jordan, R.W. 2011. Coccolithophores. En: Schaechter M (ed) *Eukaryotic Microbes*. San Diego, USA, 235-246.
- Kameo, K. y Furukawa, N., 2007. Analysis of crystallographic directions in, *Braarudosphaera bigelowii* and Neogene discoasters: preliminary report on nannolith crystallography. *Journal of Nannoplankton Research.*, 29 (1): 19-23.

- Malin, G. y Erst, G.O., 1997. Algal production of dimethyl sulfide and its atmospheric role. *Journal of Phycology* 33: 889-896.
- Manton, I., 1964. Further observations on the fine structure of the haptonema in *Prymnesium parvum*. *Archive Mikrobiologie* 49: 315-330.
- Mizukawa, Y., Miyashita, Y., Satoh, M., Shiraiwa, Y. y Iwasaka, M., 2015. Light intensity modulation by coccoliths of *Emiliana huxleyi* as a micro-photo-regulator. *Sci. Rep.* 5, 13577; doi: 10.1038/srep13577.
- Murphy, D. B. 2001. *Fundamentals of light microscopy and electronic imaging*. Wiley - Liss, Inc.
- Patil, S. M., Mohan, R., Shetye, S., Gazi, S., y Jafar, S., 2014. Morphological variability of *Emiliana huxleyi* in the Indian sector of the Southern Ocean during the austral summer of 2010, *Marine Micropaleontology*, 107, 44–58, doi:10.1016/j.marmicro.2014.01.005.
- Pienaar, R.N., 1994. Ultrastructure and calcification of coccolithophores. En: Winter, A. y Siesser, W. (eds) *Coccolithophores*. Cambridge: Cambridge University Press, 13-37.
- Rowson, J.D., Leadbeater, B.S.C. y Green, J.C., 1986. Calcium carbonate deposition in the motile (*Crystallolithus*) phase of *Coccolithus pelagicus* (Prymnesiophyceae). *British Phycological Journal* 21, 359-370.
- Saleh, Bahaa E. A., Teich, Malvin C., 1991, *Fundamentals of photonics*. John Wiley&Sons, Inc.
- Shribak, M.I., Oldenbourg, R., 2002. Scanning aperture polarized light microscope: observation of small calcite crystals using oblique illumination. In: Conchello, J.A., Cogswell, C.J., Wilson, T. (Eds.), *Three-Dimensional and Multidimensional Microscopy: Image Acquisition and Processing IX*. Proc. SPIE 4621, pp. 104–109.
- Thierstein, H.R. y Young, J.R. (eds), 2004. *Coccolithophores: from molecular processes to global impact*. Springer Berlin Heidelberg, 1-29.
- Tyrrell, T., Young, J.R. y Steele, J.H., 2009. Coccolithophores. *Encyclopedia of Ocean Sciences (Second Edition)*. Oxford: Academic Press, 606-614.
- Waine, R., 2014. *Light and video microscopy (Second Edition)*. Elsevier, 114.
- Westbroek, P., Young, J.R. y Linschooten, K., 1989. Coccolith Production (Biom mineralization) in the Marine Alga *Emiliana huxleyi*. *Journal of Eukaryotic Microbiology* 36 (4), 368-373.

- Wolfgang Tegethoff (Ed.), 2001. Calcium Carbonate: From the Cretaceous Period into the 21st Century. Ed. Birkhäuser.
- Young, J.R. y Bown, P., 1997. Higher classification of calcareous nannofossils. Journal of Nannoplankton Research 19, 15-20.
- Young, JR., 1994. Function of coccoliths. En: Winter A y Siesser WG (eds) Coccolithophores. Cambridge: Cambridge University Press, 63-82.
- Young, J.R., Henriksen, K., 2003. Biomineralization within vesicles: the calcite of coccoliths. Dove, P.M., De Yoreo, J.J. & Weiner, S. (Eds). Biomineralization. Reviews in Mineralogy and Geochemistry, 54, 189-215.
- Young, J. R., Didymus, J. M. y Mann, S., 1991. On the reported presence of vaterite and aragonite in coccoliths of *Emiliana huxleyi*, Botanica Marina, 34, 589-591.
- Young, J.R., Didymus, J.M., Bown, P.R., Prins, B. Mann, S. 1992. Crystal assembly and phylogenetic evolution in heterococcoliths. Nature, 356: 516-518.
- Young, J. R., Geisen, M., Cros, L., Kleijne, 2003. A guide to extant coccolithophore taxonomy, Journal of Nannoplankton Research, Special Issue 1, 125 pp.



Capítulo II

Metodología

Capítulo II: Metodología

Microscopio

En 1954, Kamptner afirmó que la figura de interferencia que muestran los cocolitos, cuando se observan con un microscopio que utiliza luz polarizada, depende únicamente de la especie a la que pertenezca. Desde entonces, el estudio y análisis descriptivo de los cocolitos se ha realizado utilizando de manera habitual microscopios polarizadores.

Cuando se habla de microscopio polarizador se hace referencia únicamente al uso de luz polarizada lineal. Pero, como se ha visto en el capítulo anterior, éste no es el único tipo de polarización que existe, por lo que es necesario especificar si el tipo de polarización que se utiliza es polarización lineal o circular.

Microscopio polarizador (lineal)

Además de contar con los elementos básicos de cualquier microscopio óptico: sistema de iluminación, condensador, platina para colocar las muestras, objetivos y oculares, los microscopios que utilizan polarización lineal están formado por los siguientes elementos (figura 2.1):

- Un polarizador lineal situado antes del condensador, que transforma la luz procedente de la fuente de iluminación, que no está polarizada, en luz polarizada lineal. Generalmente se coloca de tal forma que el eje de polarización sea horizontal respecto al observador (derecha/izquierda).
- Una platina móvil que permite la rotación de las muestras y el ajuste del eje de rotación, para que el eje de rotación de la muestra coincida con el eje óptico del microscopio, de tal forma que la muestra permanezca centrada en el campo de visión al rotar la platina (en algunos modelos este ajuste se realiza en el revolver de los objetivos).
- Un segundo polarizador lineal, también llamado analizador, que se coloca entre el objetivo y el ocular. Este polarizador debe tener su eje de transmisión perpendicular al eje del primer polarizador. Algunos modelos permiten la rotación de ambos polarizadores.

Los objetivos usados cuando se usa luz polarizada deben estar contruidos de tal manera que sus lentes no estén sometidas a tensiones que puedan afectar a la polarización de la luz que pasa a través de ellas. Habitualmente los fabricantes graban las letras “pol” en los objetivos indicados para utilizar luz polarizada.

Algunos modelos de microscopios polarizadores incluyen también una lente entre los objetivos y los oculares llamada lente de Bertrand, lo que permite el ajuste y calibración del microscopio y la observación conoscópica de muestras. En el caso de no disponer de lente de Bertrand, observaciones similares se pueden realizar simplemente retirando uno de los oculares.

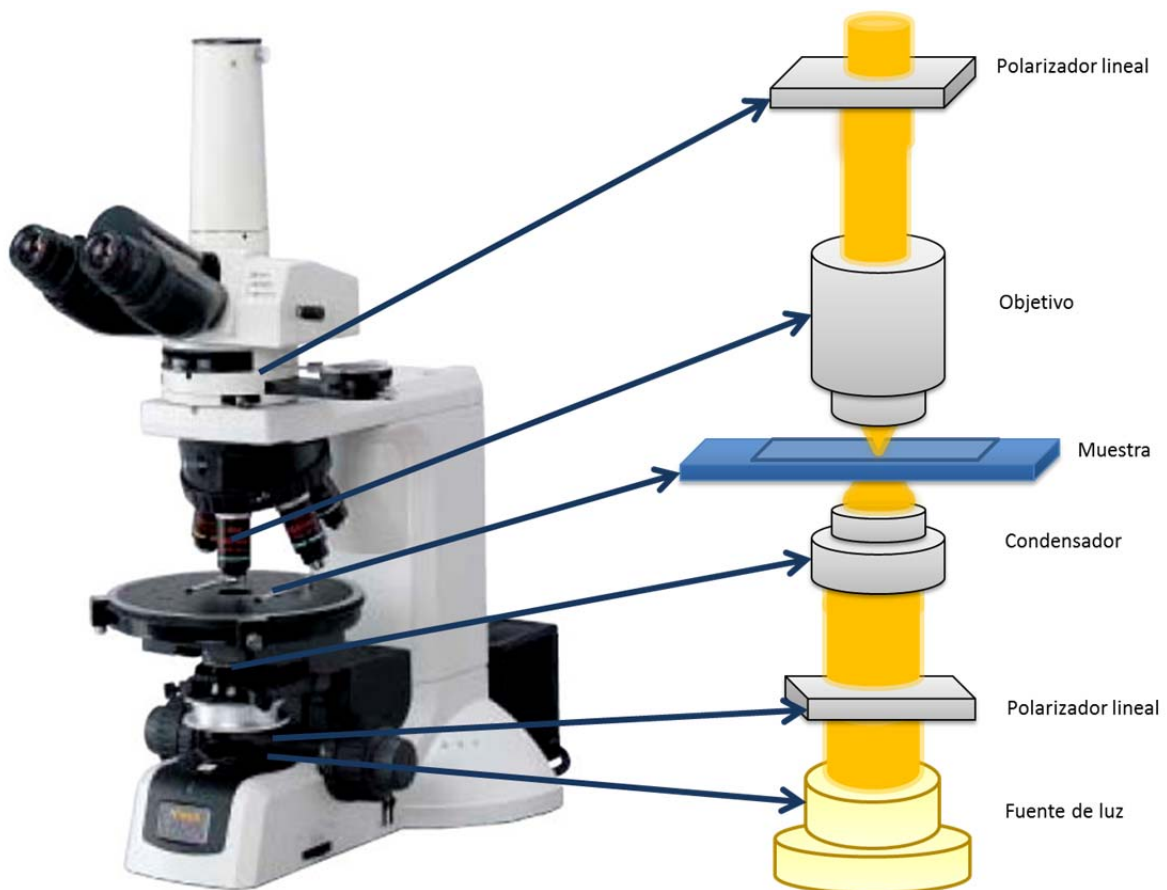


Fig. 2.1 Principales elementos de un microscopio polarizador (lineal).

Al utilizar un microscopio de este tipo, la muestra se ilumina con luz polarizada lineal. Si el material a observar es birrefringente, al atravesar la muestra cada rayo de luz se dividirá en dos, y ambos rayos tendrán un desfase relativo que, como ya se ha visto, estará relacionado con el ángulo entre el plano de polarización, el eje óptico del cristal, el tipo de luz empleada, el espesor del material y la diferencia entre los índices de refracción ordinario y extraordinario.

Cuando los rayos salen del cristal, existirá un retardo entre ellos, que suele ser del orden de nanómetros.

Cuando los rayos, tras haber atravesado la muestra, entran en el polarizador superior, también llamado analizador, ambos rayos interfieren entre sí, originando una figura de interferencia con tonos y colores que aparecen en un orden determinado y se van repitiendo con menor intensidad. Antes de que aparezca el primer color, amarillo, se observa una zona grisácea de distinta intensidad.

La formación de colores de interferencia fue observada y explicada por Newton en su *Optica*, y en el caso de los minerales fue estudiada en detalle por Michel-Lévy, quien en 1888 publicó una tabla con los colores de interferencia producidos por diversos minerales según su espesor en su obra *Les Minéraux des Roches*. Esta tabla ha sido perfeccionada desde entonces, siendo la más reciente la publicada por Sørensen (2012) (figura 2.2).

El uso más común de los microscopios polarizadores en geología se da en el campo del análisis e identificación de los minerales que forman una roca. Para ello se corta una fina lámina de la muestra de espesor conocido. Al tener toda la lámina el mismo espesor, y ser iluminada con el mismo tipo de luz, el desfase entre los rayos, y por tanto su color, dependerá de las características de cada uno de los minerales que forman la lámina. Al comparar los colores y tonalidades observados con los que aparecen en la tabla de Michel-Lévy se puede saber de qué minerales está formada la muestra.

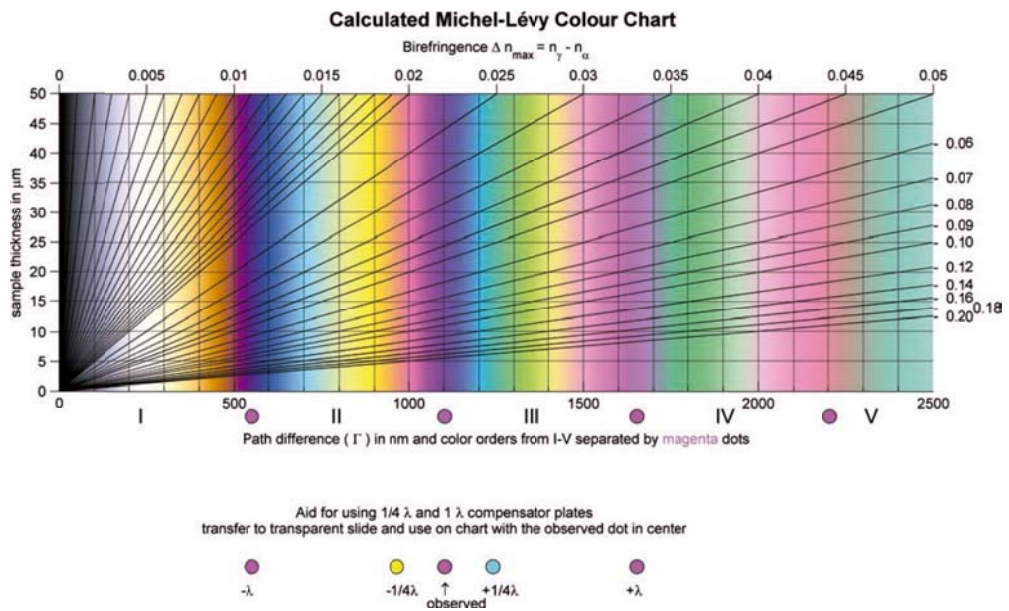
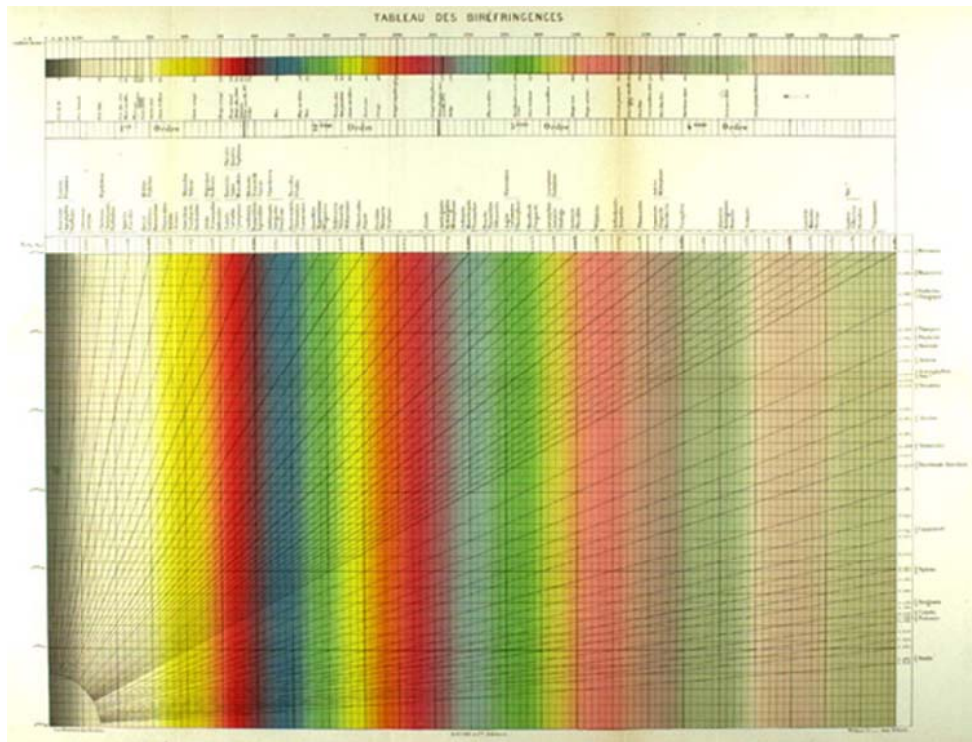


Fig. 2.2 Tablas mostrando los distintos colores de interferencia en función del espesor y de la diferencia de índices de refracción del material analizado, publicadas por Michel-Lévy en 1888 (superior) y por Sørensen en 2012 (inferior).

Microscopio polarizador (circular)

Con el fin de utilizar polarización circular, el microscopio polarizador debe estar también equipado con (figura 2.3):

- Una lámina retardante $\lambda/4$ colocada después del primer polarizador inferior y antes de que la luz ilumine la muestra.
- Otra lámina $\lambda/4$ entre el objetivo y el segundo polarizador lineal.

Las láminas $\lambda/4$ se fabrican de tal forma que su eje óptico es perpendicular al eje del microscopio, por lo que cuando sobre ellas incide luz polarizada lineal con un ángulo de 45° , las dos componentes en las que se descompone el campo eléctrico, E_x y E_y son iguales. Ambas seguirían la misma trayectoria en el interior de la lámina, pero se irían retrasando una respecto de otra, de tal forma que al abandonar la placa, el retraso sería de $\lambda/4$, transformando la luz polarizada lineal inicial en luz polarizada circular. Por tanto es necesario que ambas láminas estén orientadas exactamente a 45° respecto a las direcciones de transmisión de los polarizadores lineales.

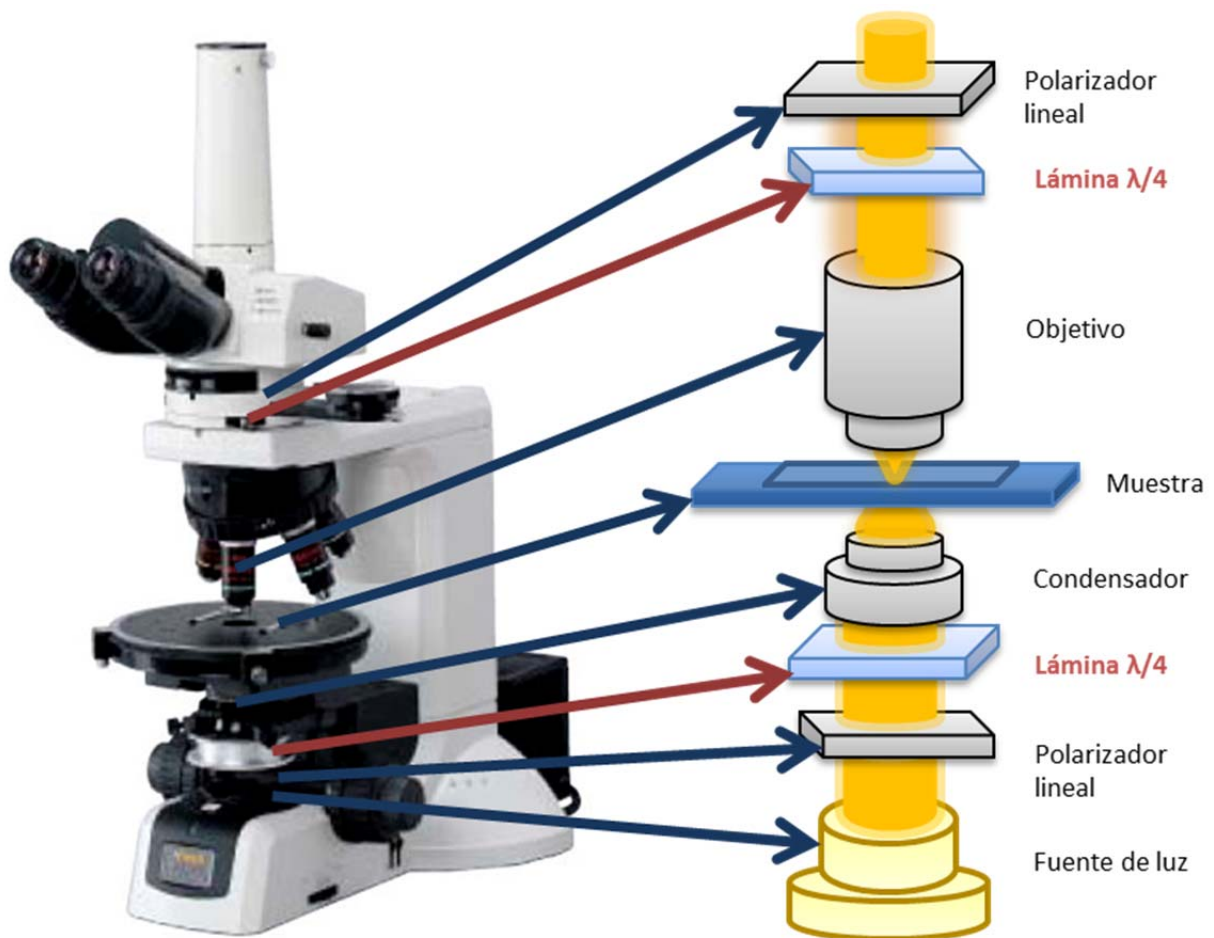


Fig. 2.3 Principales elementos de un microscopio polarizador (circular)

El modelo de microscopio utilizado en el presente trabajo ha sido un Nikon Eclipse LV100POL equipado con un objetivo 100x H/N2. Ya que en su configuración original este modelo tiene el polarizador unido al sistema del condensador, lo que dificulta la inserción y manipulación de la lámina $\lambda/4$ inferior, que debe estar entre ambos, se ha sustituido el polarizador inferior con el que viene equipado por defecto el microscopio por uno del tipo *de Senarmont*, utilizado frecuentemente en microscopía DIC y que está formado por un polarizador lineal y una lámina $\lambda/4$. En la configuración original, el polarizador lineal se puede rotar y la lámina queda fija. Con el fin de poder pasar fácilmente de polarización lineal a circular, la pieza que contiene la lámina se aflojó previamente. La lámina $\lambda/4$ superior se colocó en la hendidura que el microscopio tiene para tal fin.

Es importante que todo el sistema óptico esté bien centrado, con los polarizadores lineales perfectamente ajustados perpendicularmente y las láminas $\lambda/4$ en ángulos de 45° respecto a ellos.

Para la captura de imágenes se utilizó una cámara digital Nikon DS-Fi1 controlada mediante el programa de captura Nis-Elements.



Fig. 2.4 Equipo empleado.

Programa C-Calcita

Entre las principales aplicaciones de la polarización circular destaca la posibilidad de realizar mediciones biométricas de los diferentes cocolitos y nanolitos a partir de imágenes de las muestras tomadas sin necesidad de rotar la platina.

Además de las habituales medidas de longitud, el hecho de que la forma del cocolito y su brillo no dependan del ángulo de rotación, dependiendo la intensidad de luz en cada punto del cocolito únicamente de sus características morfométricas, hace que se pueda estimar su espesor en cada punto, y a partir de él calcular el volumen.

Con el fin de realizar mediciones biométricas de forma automática, y en especial de calcular el volumen de cocolitos individuales, así como determinar el flujo de carbonato debido a cocolitos presente en una muestra, se ha desarrollado un programa escrito en Matlab que se ha denominado C-Calcita (figura 2.5). Parte del código de este programa se ha registrado en el Registro General de la Propiedad Intelectual con el número de asiento 00/2014/1523.

El ejecutable del programa C-Calcita se ha incluido como anexo IV de la presente tesis.



Fig. 2.5 Aspecto general del programa C-Calcita.

Algunos aspectos que se van a describir a continuación son:

- Carga de una o múltiples imágenes
- Eliminación del ruido
- Calibración de las distancias vertical y horizontal
- Calibración del espesor
- Selección de zonas de interés
- Mediciones
- Perfiles
- Imagen 3D
- Medición de áreas, volúmenes y masa
- Medición de flujo de carbonato debido a cocolitos
- Automatismos

Carga de una o múltiples imágenes

Las imágenes tomadas con la cámara acoplada al microscopio son capturadas con el programa de Nikon NisElements y almacenadas en formato jpg o tiff (se recomienda el uso de tiff para que la compresión del archivo sea mínima). Estos archivos son cargados en el programa C-Calcita mediante el botón "Load image". Si se cargan varios archivos a la vez, el programa permite pasar de uno a otro utilizando el botón "Next".

Como el programa está diseñado únicamente para trabajar en la región de grises, las imágenes en color son automáticamente convertidas a escala de gris. En cualquier momento se puede visualizar de nuevo la imagen en color original pulsando el botón "Refresh".

Eliminación del ruido

Ya que parte de la luz presente en la imagen se debe a fenómenos como la luz ambiental, reflexión en las piezas del microscopio o imperfecciones en los polarizadores, parte de la luz captada en la imagen no se debe a la interferencia de las ondas de luz que han atravesado la muestra. Por ello debe ser eliminada de la imagen original como paso previo a su medición.

Para ello el usuario puede utilizar el botón "Value" para seleccionar y medir el nivel de gris correspondiente a una zona de la imagen en la que no hay nada y posteriormente restar ese nivel de gris a toda la imagen mediante los controles "Grey level filter", seleccionando el nivel de gris a eliminar y pulsando el botón "Filt→Im ". También puede calcular el valor mínimo de gris con el botón "calculate" de la zona "brightness" y eliminarlo con el botón "filter min".

Una vez cargada la imagen, un punto crítico es la calibración de los parámetros de la misma, lo que permitirá realizar mediciones cuantitativas.

Calibración de las distancias vertical y horizontal

Una imagen es en realidad un mosaico de píxeles, siendo cada uno de ellos un cuadrado. Es necesario conocer con qué distancia real se corresponde cada uno de los lados de dicho cuadrado.

Para ello se toma con el microscopio una imagen de un micrómetro (figura 2.6), con el microscopio configurado en las mismas condiciones ópticas en las que se tomarán luego el resto de imágenes (polarizadores, objetivos, multiplicador, cámara y resolución de la imagen). Esa imagen se carga en el programa C-Calcita.

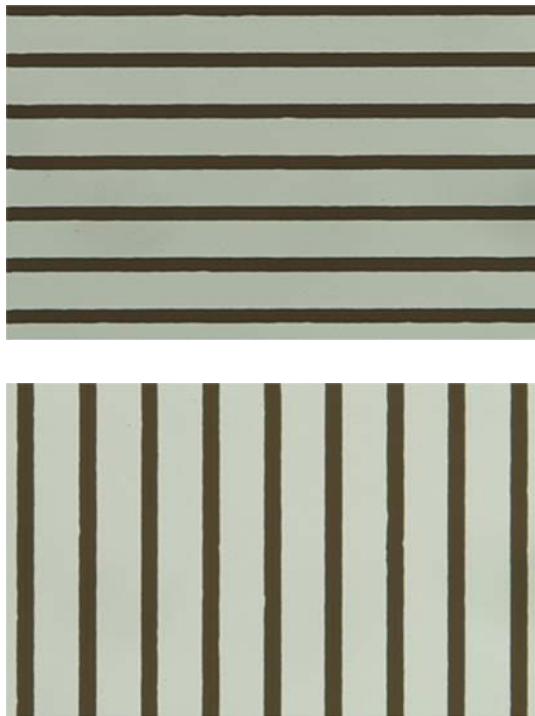


Fig. 2.6 Imágenes del micrómetro utilizadas para realizar la calibración horizontal y vertical.

Pulsando el botón “Measure (px)” aparece sobre la imagen una barra que el usuario puede manipular con el ratón, moviéndola o cambiando su tamaño. El programa dice la longitud en píxeles de la zona de la imagen delimitada por la barra. Como la escala real del micrómetro es conocida, el usuario sólo tiene que trazar una línea entre una o varias marcas del micrómetro, ver a cuántos píxeles de la imagen equivalen y, tras dividir la longitud entre el número de píxeles, introducir esa medida en la casilla preparada para ello en el programa: “Scale: 1px = μm ”.

Calibración del espesor

Como se ha visto anteriormente, al utilizar luz polarizada para la observación de los cocolitos, el color está relacionado con la distancia que ha recorrido la luz dentro del cocolito, es decir, con su espesor. Si dicho espesor es menor que $1,55 \mu\text{m}$, el color obtenido varía con distintos tonos de gris.

Una imagen en blanco y negro es una matriz en la que a cada pixel se le asocia un nivel de gris, por lo que es necesario hacer una equivalencia entre cada nivel de gris y su correspondiente espesor.

Para realizar la calibración del espesor correspondiente a cada nivel de gris se debe tomar una imagen de una estructura de calcita que tenga una forma cilíndrica, como es el caso de una *Rhabdosphaera* o de algunas espículas calcáreas. La intensidad lumínica del microscopio debe mantenerse constante a lo largo de cada sesión, sin variar ninguno de los elementos que pueden alterar la cantidad de luz que llega a la muestra o la intensidad capturada y registrada por la cámara después de pasar a través de la misma, como son el tiempo de exposición o la ganancia.

Con el programa C-Calcita se puede medir en diversos puntos el ancho de la forma cilíndrica (botón “measure (μm)”) y su nivel de gris en el punto medio (botón “value”). Al tener una sección circular (figura 2.7), el nivel de gris en el punto medio será el correspondiente a un espesor igual a la anchura en ese punto, obteniendo una tabla de valores que permitirán el cálculo de una función que relacione ambas magnitudes.

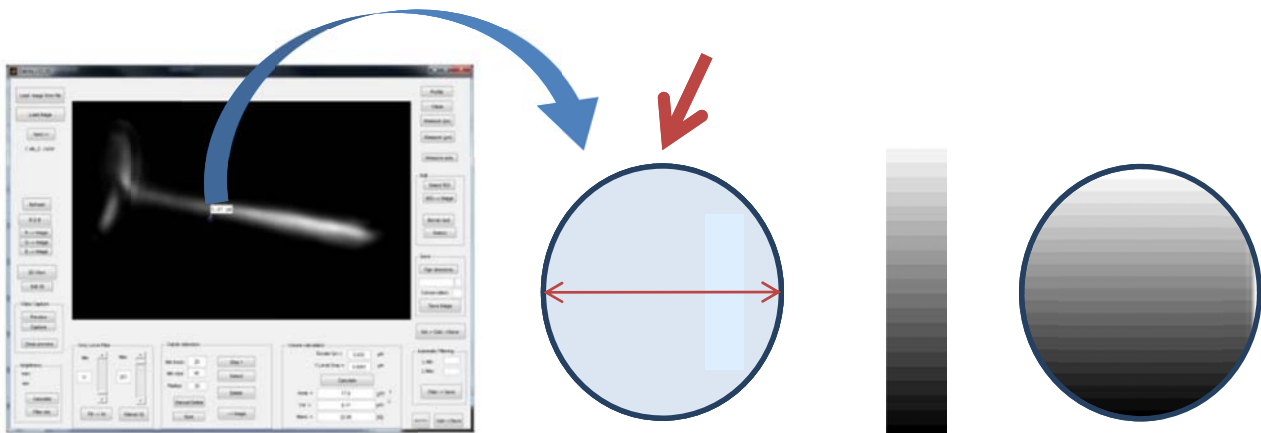


Fig. 2.7 Medición de la anchura y del nivel de gris en el punto medio de una Rhabdosphaera. Como su sección es circular, su ancho en el punto central (señalado por la flecha roja) se corresponderá con el espesor.

El primer estudio que estimó el espesor de los cocolitos basándose en el nivel de gris fue Beaufort (2005), si bien utilizando luz polarizada lineal en lugar de circular, lo que planteaba diversos problemas e incertidumbres que se pueden solucionar si se emplea luz polarizada circular, como se verá en el siguiente capítulo. En este primer artículo se afirmaba que la relación entre el espesor y el nivel de gris era lineal, por lo que la primera versión del programa C-Calcita se diseñó con este tipo de relación. Pero durante el periodo de realización de la presente tesis, diversos autores, entre ellos el propio Beaufort (2015) siguiendo a Sørensen (2013) han puesto de manifiesto que la relación entre el nivel de gris capturado por la cámara y el espesor del cristal de calcita se corresponde en el rango 0-1,55 μm con una función en forma de “S” (figura 2.8).

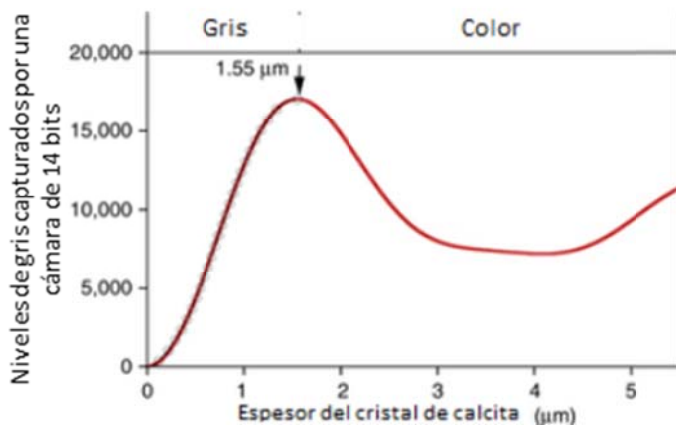


Fig. 2.8 Relación entre el nivel de gris capturado por una cámara de 14 bits de profundidad de color y el espesor de un cristal de calcita. Modificado de Beaufort (2015).

Matemáticamente una función con esta forma se puede representar como:

$$N_g = A \cdot \text{sen}^2(B \cdot T_h) \quad (\text{Ecuación 1})$$

Donde:

N_g es el nivel de gris

T_h es el espesor

A es un valor que variará según la configuración del sistema, dependiendo de factores como la intensidad de luz con la que se ilumine la muestra, del tipo de cámara empleado y de los parámetros de captura de la imagen.

B es un parámetro que se puede calcular teniendo en cuenta que la función alcanza su valor máximo cuando el espesor es de 1,55 μm . En ese caso:

$$\text{sen}^2(B \cdot 1,55) = 1$$

Que se cumple cuando:

$$B \cdot 1,55 = \pi/2$$

De donde se obtiene:

$$B = \pi/(2 \cdot 1,55), \text{ es decir: } B = \pi/3,1$$

Si se sustituye este valor en la ecuación 1 y se despeja el espesor, se tiene que:

$$T_h = \frac{3,1}{\pi} \arcsen(\sqrt{A \cdot N_g}) \quad (\text{Ecuación 2})$$

Teniendo esto en cuenta, el programa C-Calcita fue modificado, y en su última versión utiliza esta función arcoseno para calcular el espesor a partir del nivel de gris.

Por tanto, mientras que para la primera versión del programa los datos de espesor y nivel de gris se ajustaban a una línea recta, introduciendo el valor de calibración en el recuadro "1 Grey level = μm) en la siguiente versión del programa el botón "Calibrate " permite acceder a otra ventana (figura 2.9) en la que los valores medidos pueden ser introducidos en una tabla, representados gráficamente (botón "Plot") y, tras pulsar el botón "Calculate model", el programa calcula el valor del parámetro A en la ecuación (2) que mejor se ajusta a los

valores medidos, representando la curva de ajuste calculada junto a los valores introducidos. El valor obtenido debe ser posteriormente introducido en el espacio “Calib. Coef.?” de la ventana principal del programa.

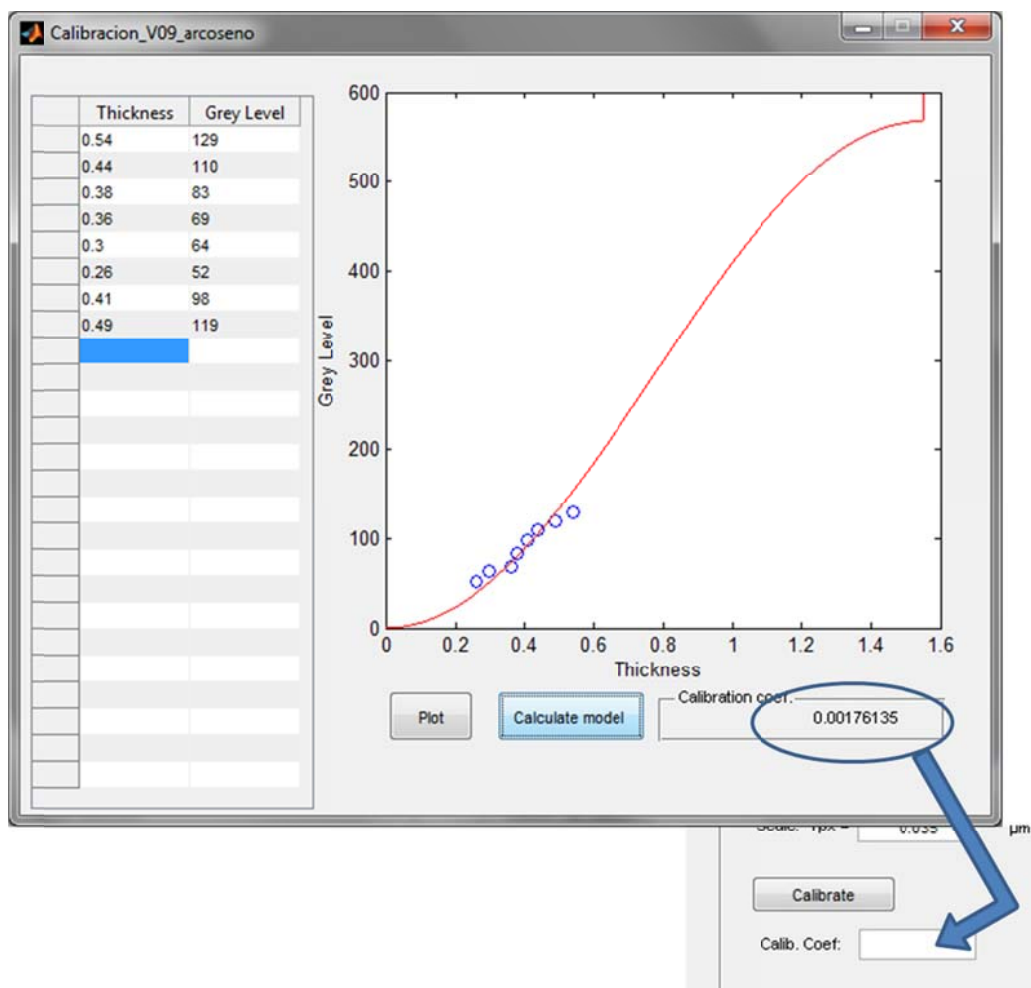


Fig. 2.9 Pantalla del programa C-Calcita que permite la introducción de los valores anchura/espesor y nivel de gris para realizar su ajuste a una función del tipo arcoseno. El valor calculado debe introducirse en la casilla indicada de la ventana principal del programa.

La figura tridimensional calculada a partir de la calibración tipo arcoseno se ajusta a la forma esperada (figura 2.10a) y una comparación entre ambos tipos de calibraciones da como resultado que, al recalculer los valores de espesor para los mismos niveles de gris que se habían medido en la imagen, y compararlos con el espesor medido, al utilizar una calibración lineal la diferencia media entre ellos es del 9,8 %, mientras que al utilizar una calibración del tipo arcoseno la diferencia media es del 5,6 %. (figura 2.10b).

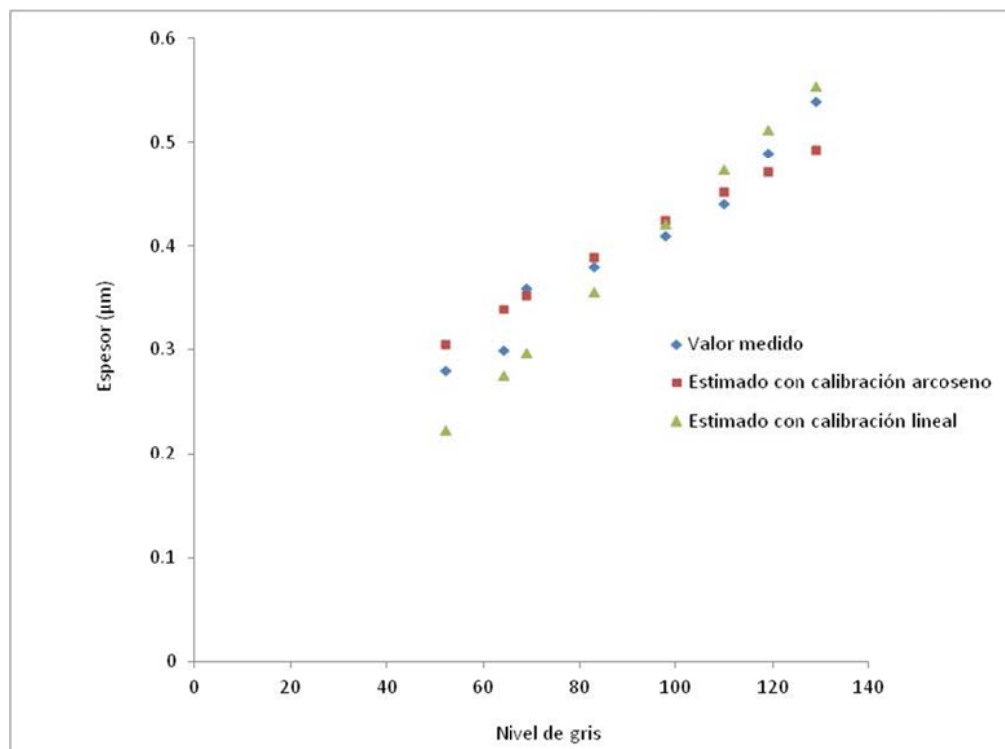
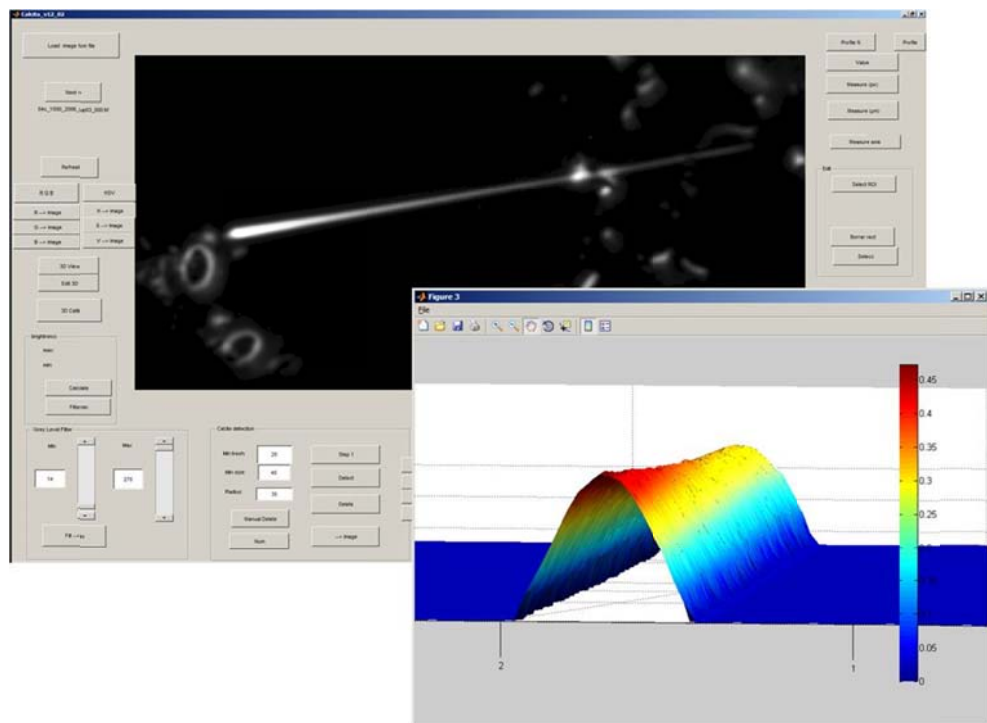


Fig. 2.10 a) Calibración del espesor utilizando una espícula calcárea (imagen superior), representación tridimensional de una sección de dicha espícula tras la calibración (centro) y b) diferencia entre los valores medidos y los calculados utilizando una calibración lineal o una con la función arcoseno.

A la hora de tomar las imágenes, los valores de luz y apertura en el microscopio y los parámetros de control de la cámara deben ser fijados a niveles apropiados para que ninguna de las partes de los cocolitos a estudiar quede saturada. Estos parámetros dependerán de cada microscopio y de cada cámara. Con la cámara utilizada, que únicamente dispone de 8 bits de profundidad de color, la intensidad de luz se registra con un valor que varía entre 0 y 255. Una vez que se alcanza el valor de 255, para una determinada intensidad de luz, Todos los puntos de la imagen que reciban una intensidad de luz mayor seguirán registrando un valor de 255, por lo que se perdería esa información, y se dice que en esos puntos la imagen está saturada.

Variar la intensidad de luz dependiendo del tamaño del cocolito que se desee medir permite obtener una imagen más suave, aprovechando mejor la profundidad de color de la cámara. Si no se hiciera así y se estableciera una calibración en la que, como ejemplo, el valor de 255 se estableciera en un espesor de $1,55 \mu\text{m}$, cada nivel de gris equivaldría a $1,55 / 255 = 0.006 \mu\text{m}$, mientras que si se establece la luz de tal manera que la saturación equivalga a, por ejemplo, $0,6 \mu\text{m}$, cada nivel de gris equivaldrá a $0,002 \mu\text{m}$, consiguiendo una resolución mayor del espesor del cocolito. (figura 2.11)

En el caso de utilizar una cámara con mayor profundidad de color, este ajuste puede ser innecesario ya que, como ejemplo, una cámara de 16 bits cuenta con 65.536 niveles, frente a los 256 de una cámara de 8 bits.

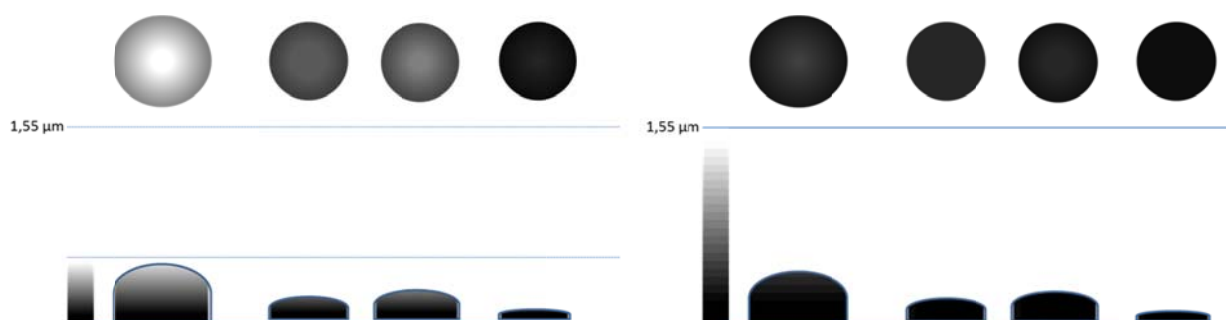


Fig. 2.11 Diferencias entre una calibración con una cámara de 255 niveles de gris en la que la saturación se hace coincidir con un espesor de $1,55 \mu\text{m}$ (derecha) o con un espesor menor (izquierda). En la fila inferior se muestra la relación visual entre el espesor y el nivel de gris, y en la fila de superior se muestra cómo se verían partículas de diferentes espesores. En el caso de que la saturación sea a $1,55 \mu\text{m}$, si sólo se desea observar partículas de espesores sensiblemente menores, la resolución obtenida es menor, al no aprovechar todos los niveles de gris disponibles.

Una vez conocido el espesor correspondiente a cada pixel que forma la imagen, el volumen es calculado sumando, para cada pixel de la región seleccionada, el producto de su superficie por el espesor:

$$Volumen = \sum_{i=1}^n Superficie_i \cdot Espesor_i$$

Donde n es el número de píxeles de la imagen seleccionada.

Una vez que se ha calculado el volumen, la masa se calcula utilizando un valor de 2,7 g/cm³, correspondiente a la densidad de la calcita.

Selección de zonas de interés

Las zonas de interés de una imagen se pueden seleccionar mediante el botón “Select ROI”, que permite hacer zoom al seleccionar una zona rectangular de la imagen, o con el botón “Select”, que permite seleccionar libremente una zona de la imagen, trazando su contorno con el ratón y haciendo doble click.

Mediciones

Una vez el programa está calibrado, se pueden tomar medidas individuales de toda la imagen o de aquellas zonas de más interés seleccionadas previamente.

Se pueden utilizar los botones “Measure (px)” y “Measure (µm)” para trazar una línea y ver su longitud en píxeles o en micras.

El botón “Measure Axis” permite trazar el contorno de un cocolito manualmente y, al hacer doble click con el ratón obtener las medidas en micras de su eje mayor y menor.

El botón “Value” permite conocer el valor de gris y el espesor de un punto de la imagen seleccionado con el ratón.

Perfiles

El botón “profile” permite trazar libremente una línea sobre la imagen y, haciendo doble click aparece una pantalla con el perfil transversal, con las unidades correspondientes.

Imagen 3D

El botón “3D calib” hace que aparezca una ventana independiente con una representación en tres dimensiones de la zona seleccionada, según la escala establecida. Esta imagen se puede mover, ampliar y rotar. Características como la paleta de colores, o la iluminación de la imagen pueden ser modificadas en los menús de la imagen (figura 2.12).

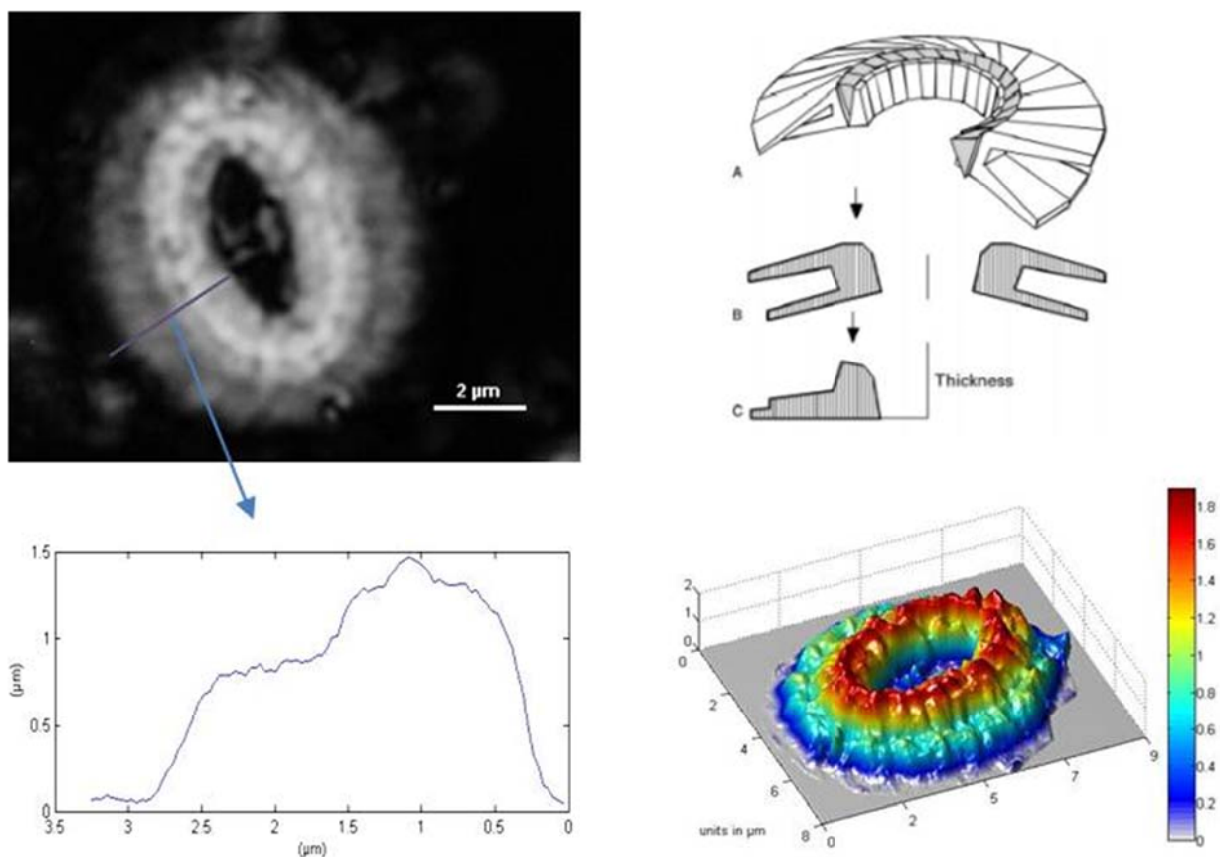


Fig. 2.12 Imagen de un cocolito de *Coccolithus pelagicus* tomada con luz polarizada circular, perfil y representación 3D. En la esquina superior derecha se muestra la estimación del perfil y el espesor para un cocolito similar publicada por Young and Ziveri (2000).

Medición de áreas, volúmenes y masa

Con el botón “Calculate” el programa calcula cuál es el área de la imagen que está ocupada por alguna partícula de calcita, le asigna a cada pixel una altura según sea su nivel de gris, y calcula su área, su volumen y su masa, tomando la densidad de la calcita como $2,7 \text{ g/cm}^3$. Los valores calculados son mostrados en las casillas correspondientes, medidos en μm^2 , μm^3 y μg . (figura 2.13).

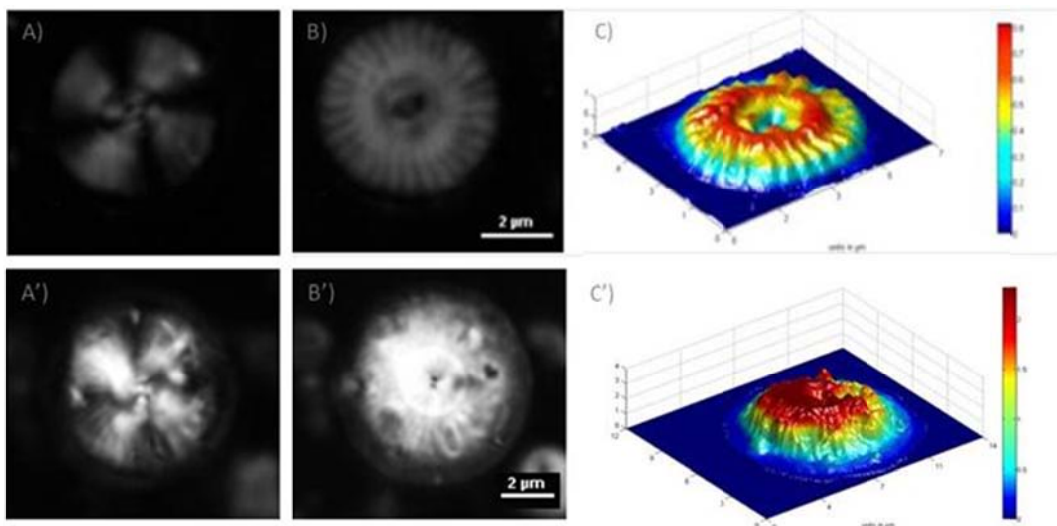


Fig. 2.13 Estimación del volumen de un cocolito a partir de su nivel de gris. En la fila superior se muestra un escudo proximal aislado de Calcidiscus y en la fila superior se muestra un cocolito completo, observado con luz polarizada lineal (A y A'), circular (B y B') y representación 3D realizada en C-Calcita (C y C').

Medición de flujo de carbonato debido a cocolitos

El programa se puede utilizar para calcular la cantidad de carbonato presente en todo el campo visual, eliminando si es necesario los fragmentos que no sean cocolitos. De ésta manera se puede conocer la cantidad de carbonato que existe en un área determinada, a partir del ancho y largo de la imagen en pixeles. Si la muestra ha sido preparada por decantación, obteniendo una distribución homogénea, a partir de la cantidad de carbonato presente en uno o varios campos visuales se podrá extrapolar para calcular la cantidad de carbonato presente en toda la muestra.

Este método, expuesto en el capítulo 5, permite, de una manera rápida y no destructiva separar el carbonato debido únicamente a cocolitos, que es algo que resulta imposible de analizar químicamente por la dificultad de aislar los cocolitos de otros pequeños fragmentos de carbonato. Además tiene la ventaja de que permite contabilizar no sólo el debido a cocolitos enteros, sino también a fragmentos de cocolitos (figura 2.14).

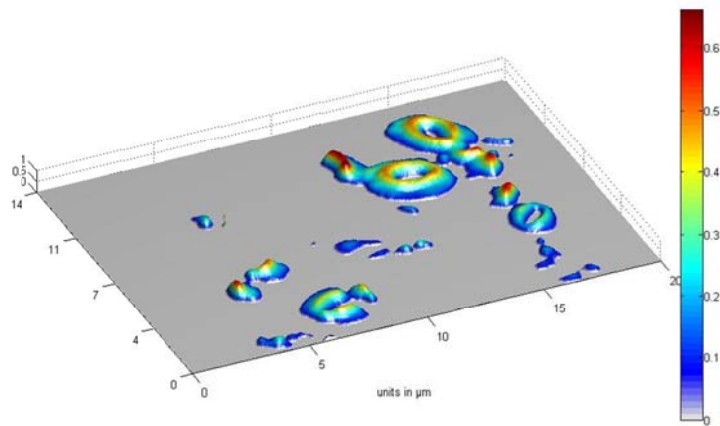
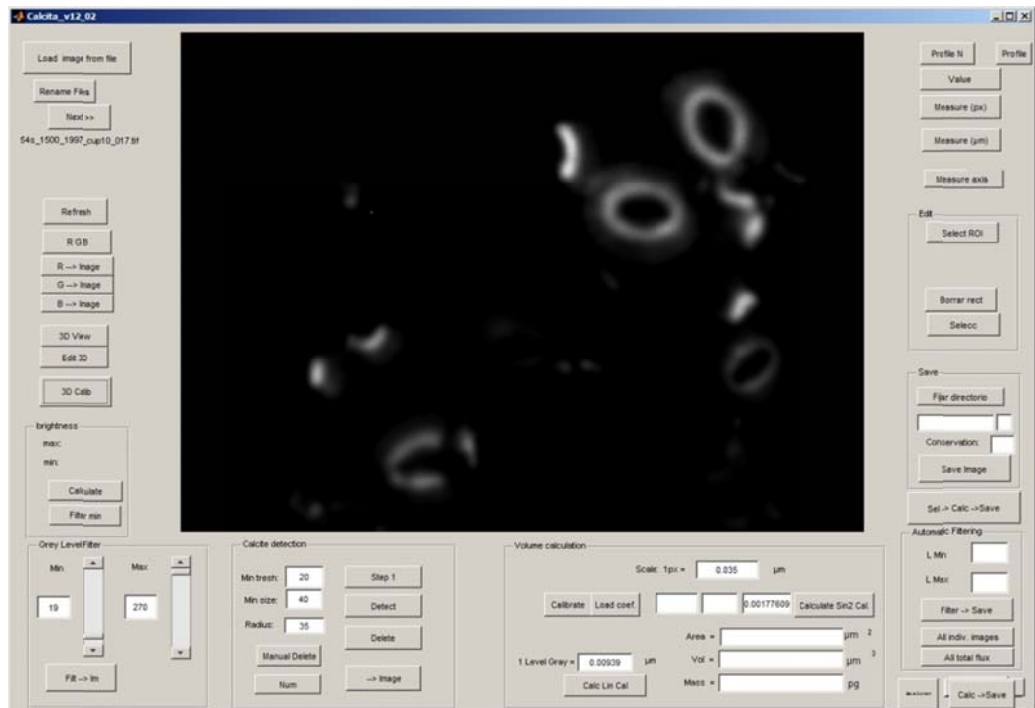


Fig. 2.14 Estimación de la cantidad de carbonato debido a coccolitos en un área en la que aparecen fragmentos de coccolitos.

Automatismos

Tras seleccionar una carpeta de trabajo con el botón “Select folder”, el usuario puede medir y guardar la imagen de trabajo con el botón “Save image”, añadiendo al nombre del archivo la información que desee.

El botón “Select -> Calc -> Save” permite seleccionar libremente con el ratón una parte de la imagen, medirla y guardarla. La parte de la imagen que ya ha sido seleccionada y guardada desaparece de la imagen, para que no pueda ser medida de nuevo.

En el caso de desear medir los cocolitos de una determinada especie en un conjunto de imágenes, el usuario puede:

1. Cargar múltiples imágenes en el programa. La primera imagen se mostrará en pantalla.
2. Asignar una carpeta de trabajo en la que se grabarán las imágenes de los cocolitos seleccionados. Si se desea, se puede poner un nombre y las características de la muestra en la casilla rectangular que está bajo el botón “Select folder” y un código relativo al estado de conservación en el recuadro “Conservation”.
3. Seleccionar manualmente el cocolito que desee medir. Al hacer doble click con el ratón, el programa automáticamente lo recortará, medirá los ejes mayor y menor, el área, volumen y masa y grabará la imagen seleccionada en la carpeta de trabajo. Toda la información se almacenará junto con el nombre de la imagen original de la que ha sido seleccionado el cocolito.

El cocolito grabado será eliminado de la imagen mostrada, para que el usuario no lo mida de nuevo.

Se podrá repetir la operación con todos los cocolitos de la imagen y, cuando desee, el usuario podrá cargar la siguiente imagen pulsando el botón “next”.

La información de cada medición queda guardada junto con el nombre de la imagen. Como complemento al programa C-Calcita, se ha desarrollado una macro en Visual Basic para Excel que lee toda la información del nombre de los archivos que estén en una carpeta seleccionada por el usuario y la escribe en las distintas celdas de una hoja de cálculo, para luego poder trabajar con los datos numéricos más fácilmente.

Selección y medición automática

En la sección “Automatic filtering” el programa permite al usuario fijar un tamaño mínimo y máximo de partículas, que debe ser escrito, en micras, en las casillas “Lmin” y “Lmax”. Tras haber seleccionado un conjunto de imágenes, la carpeta de trabajo y el nivel de ruido que debe ser eliminado, pulsando el botón “All indiv. Images” el programa detecta automáticamente todos los fragmentos presentes en la muestra, los mide y, aquellos que cumplen el criterio de tamaño son recortados y almacenados junto con la información relativa a la imagen de la que han sido extraídos, un número correlativo que sirve para identificar a cada fragmento y las medidas de eje mayor, eje menor, área, volumen y masa, junto con el coeficiente de calibración que se ha empleado. Cuando el programa finaliza con todos los fragmentos de una imagen, automáticamente pasa a la siguiente y continua así hasta que acaba de analizar todas las imágenes.

Si lo que se desea es analizar todo el carbonato presente en la muestra, el botón “All total Flux” realiza una operación similar, eliminando el nivel de ruido y midiendo toda la imagen. La información es almacenada junto con el nombre de la imagen.

Eliminación de fragmentos de calcita

Los fragmentos de calcita que no son cocolitos pueden ser eliminados manualmente, con el botón “manual delete”, que permite al usuario seleccionar con el ratón la zona de la imagen que desee y, haciendo doble click, esa zona es eliminada de la imagen de trabajo.

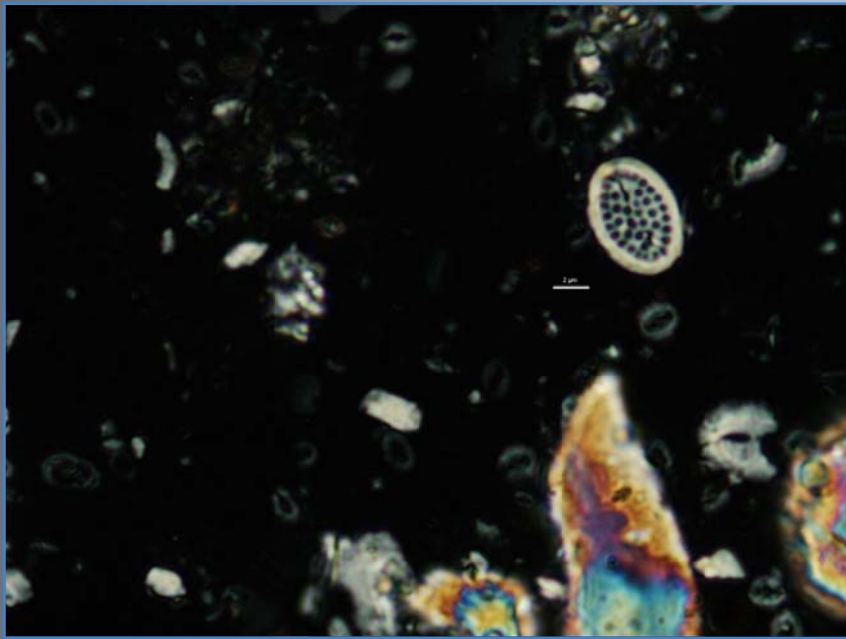
Se ha incluido también un borrado automático, basado en los colores que muestran los fragmentos de calcita de mayor espesor que los cocolitos. Para ello el usuario debe introducir un valor que se corresponderá con la diferencia entre los canales rojo y verde la imagen. El programa, en su paso 1 (botón “Step 1”) detecta las zonas de la imagen que cumplen esa condición, traza a su alrededor un contorno, a una distancia definida por el usuario en la casilla “Radius” y elimina esas zonas de la imagen al pulsar el botón “Delete”.

Bibliografía

- Beaufort, L., 2005. Mass estimates of coccoliths using the optical properties (birefringence) of calcite. *Micropaleontology* 51, 289-297.
- Beaufort, L. y Dollfus, D., 2004. Automatic recognition of coccoliths by dynamical neural networks, *Marine Micropaleontology.*, 51, 57-73.
- Beaufort, L., Barbarin, N., y Gally, Y., 2014. Optical measurements to determine the thickness of calcite crystals and the mass of thin carbonate particles such as coccoliths, *Nature Protocols*, 9, 633–642, doi:10.1038/nprot.2014.028.
- Demirkaya, O., Asyali, M.H. y Sahoo, P.K., 2008,. *Image Processing with MATLAB: Applications in Medicine and Biology*. CRC Press.
- Douglas, B.M. y Davidson, M.W., 2012, *Fundamentals of Light Microscopy and Electronic Imaging*, 2nd Edition. Wiley-Blackwell.
- Flores, J.A. y Sierrro, F.J., 1997. Revised technique for calculation of calcareous nannofossil accumulation rates. *Micropaleontology*, 43(3), 321-324.
- Gonzalez, R.C., Woods, R.E. y Eddins, S.L., 2010. *Digital image processing using Matab*. McGraw Hill Education.
- Gribble, C.D. y Hall, A.J., 1992. *Optical mineralogy, principles and practice*. Chapman & Hall.
- Marques, O., 2011, *Practical image and video processing using MATLAB*, John Wiley & Sons, Inc.
- MathWorks, Inc., 2005. *Matlab: the language of technical computing*. MathWorks.

Theodoridi, S. y Koutroumbas, K., 2009 Introduction to Pattern recognition. A Matlab approach. Elsevier Academic Press.

Waine, R., 2014. Light and video microscopy (Second Edition). Elsevier, 114.



Capítulo III

***Observación de cocolitos con luz polarizada.
Ventajas de la polarización circular***

Capítulo III: Observación de cocolitos con luz polarizada

Ventajas de la polarización circular

Introducción

El método más usual para la observación e identificación de nanofósiles calcáreos como los cocolitos es mediante la utilización de un microscopio óptico de luz transmitida equipado con polarizadores lineales cruzados, también denominados nicoles cruzados. La muestra es iluminada con luz polarizada lineal y observada a través de un segundo polarizador lineal, también llamado analizador, con su eje orientado perpendicularmente respecto al del primer polarizador. De esta manera los materiales isotrópicos aparecen oscuros, mientras que los materiales anisotrópicos muestran diferentes intensidades y colores de interferencia, dependiendo de su forma, espesor y orientación.

Kamptner en 1954 demostró que, al observarlos utilizando polarización lineal, los cocolitos de diferentes especies muestran figuras de interferencia diferentes, y por ello la identificación taxonómica se ha realizado desde entonces en base a estos patrones característicos.

Sin embargo el uso de luz polarizada lineal tiene algunas características que pueden resultar un inconveniente para algunas aplicaciones, como es el hecho de que los cocolitos con

forma circular o elíptica muestran figuras de interferencia en forma de cruz, con algunas áreas en las que la extinción de la luz es total y otras, estructuralmente similares, donde el brillo es máximo, lo que hace que la intensidad de la imagen dependa no sólo del espesor y la forma, sino también de la orientación del cocolito respecto a los ejes de los polarizadores, variando también la forma a medida que la muestra se rota con la platina. E incluso para especies relativamente finas y formadas por una única unidad cristalina, como es el caso de los nanolitos de *Florisphaera profunda*, el espécimen completo se muestra oscuro en ciertas posiciones, lo que hace que el observador tenga que rotar la muestra para poderlos detectar.

Estas limitaciones desaparecen si se utiliza luz polarizada circular en lugar de lineal, permitiendo al observador ver todos los nanolitos presentes en la muestra sin necesidad de rotarla, con la misma forma e intensidad independientemente del ángulo de la platina, sin zonas oscuras que dificultan en ocasiones las mediciones biométricas y con una forma e intensidad que no depende de la orientación de la platina. Todas estas características hacen que el uso de luz polarizada circular tenga varias aplicaciones, entre las que destaca la posibilidad de mejorar el método propuesto en 2005 por Luc Beaufort para estimar la masa de cocolitos individuales a partir la intensidad de luz de imágenes capturadas por una cámara digital.

Aunque la polarización circular de la luz no es un fenómeno desconocido y tiene numerosas aplicaciones en diversos campos de la ciencia, desde la comunicación con sondas espaciales a la proyección y visualización en cines de películas en tres dimensiones, aún no ha sido aplicada para el estudio de los cocolitos y tiene el potencial necesario para ser una técnica importante en este campo.

Propagación de la luz dentro de los cocolitos

Cuando un rayo de luz polarizada incide de manera perpendicular al plano de un cocolito que yace de forma horizontal en la muestra (que es lo más habitual cuando la muestra ha sido preparada por decantación):

En las unidades cristalinas tipo R los rayos de luz del microscopio inciden perpendiculares al eje óptico del cristal, por lo que se separan en dos, ordinario y extraordinario, que viajan a lo largo del cristal con trayectorias coincidentes pero diferentes velocidades. De esta forma, ambos rayos emergen del mismo punto del cristal polarizados en direcciones perpendiculares y con un desfase que depende del camino óptico recorrido por cada uno.

En nanolitos como los de Discoaster o en las unidades cristalinas tipo V de los heterococolitos, los rayos que inciden de forma paralela al eje óptico no se dividen en dos, por lo que no hay rayo ordinario y extraordinario, y la calcita se comporta como un material isotrópico. Sin embargo la configuración habitual de un microscopio incluye el uso de un condensador que desvía la trayectoria de los rayos de luz que salen de la fuente (figura 3.1). La luz que pasa a través de la muestra no es un único rayo, sino un conjunto de rayos con forma cónica que viajan con distintos ángulos relativos al eje óptico del sistema, variando desde cero, que serían los coincidentes con el eje óptico del cristal, hasta un valor máximo que depende de la apertura del diafragma del condensador, conocida como Apertura Numérica. Por ello la visibilidad de las unidades V de los heterococolitos, o de nanolitos como los de Discoaster aumenta a medida que aumenta la apertura numérica del condensador.

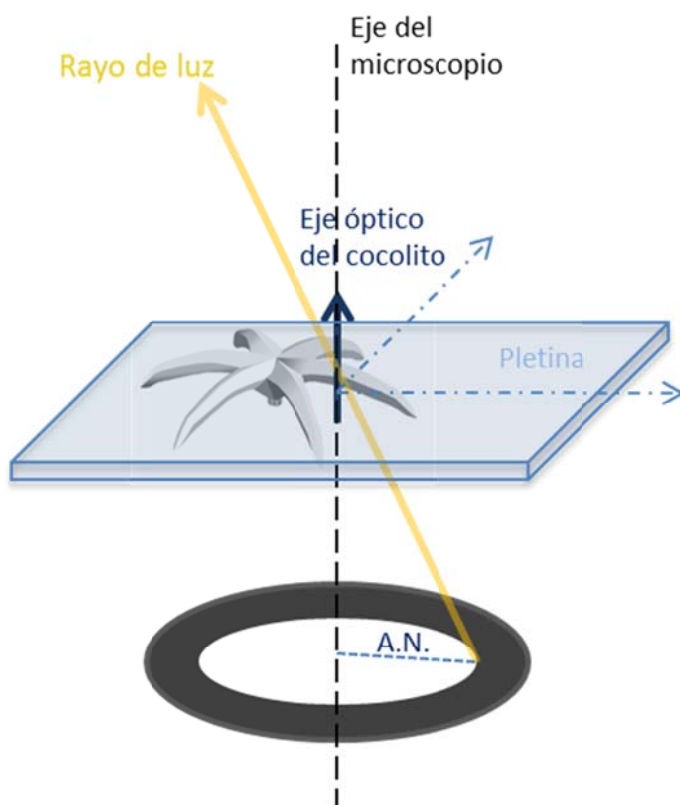


Fig. 3.1 Trayectoria de un rayo de luz desviado por el condensador.

El efecto de los rayos oblicuos se pone de manifiesto si el condensador se elimina del microscopio o si dispone de una lente que permita cancelar su efecto e iluminar la muestra con rayos que sean paralelos al eje del microscopio. En esta situación, las unidades cristalinas tipo V de los cocolitos, o los nanolitos de especies como los *Discoaster* se comportan como materiales isotrópicos, sin originar dos rayos desfasados entre sí, por lo que al observarlos en un microscopio polarizador estas unidades cristalinas se oscurecen totalmente, como se pone de manifiesto en la figura 3.2.

Cuando, tras atravesar el cocolito los rayos de luz pasan de nuevo por el polarizador lineal, también llamado analizador, interfieren entre sí. El tipo de interferencia depende de la diferencia de fase que existe entre ellos. Dependiendo del desfase entre ambos rayos, se observan variaciones de intensidad y color, que varían comenzando con distintos grados de gris cuando el espesor es menor de $1,55 \mu\text{m}$ hasta tener una serie de colores que se van repitiendo, cada vez con menor intensidad, siguiendo el patrón de colores de interferencia, observado y descrito ya por Newton, y estudiado en detalle para el caso de los diversos minerales por Michel-Levy a finales del siglo XIX.

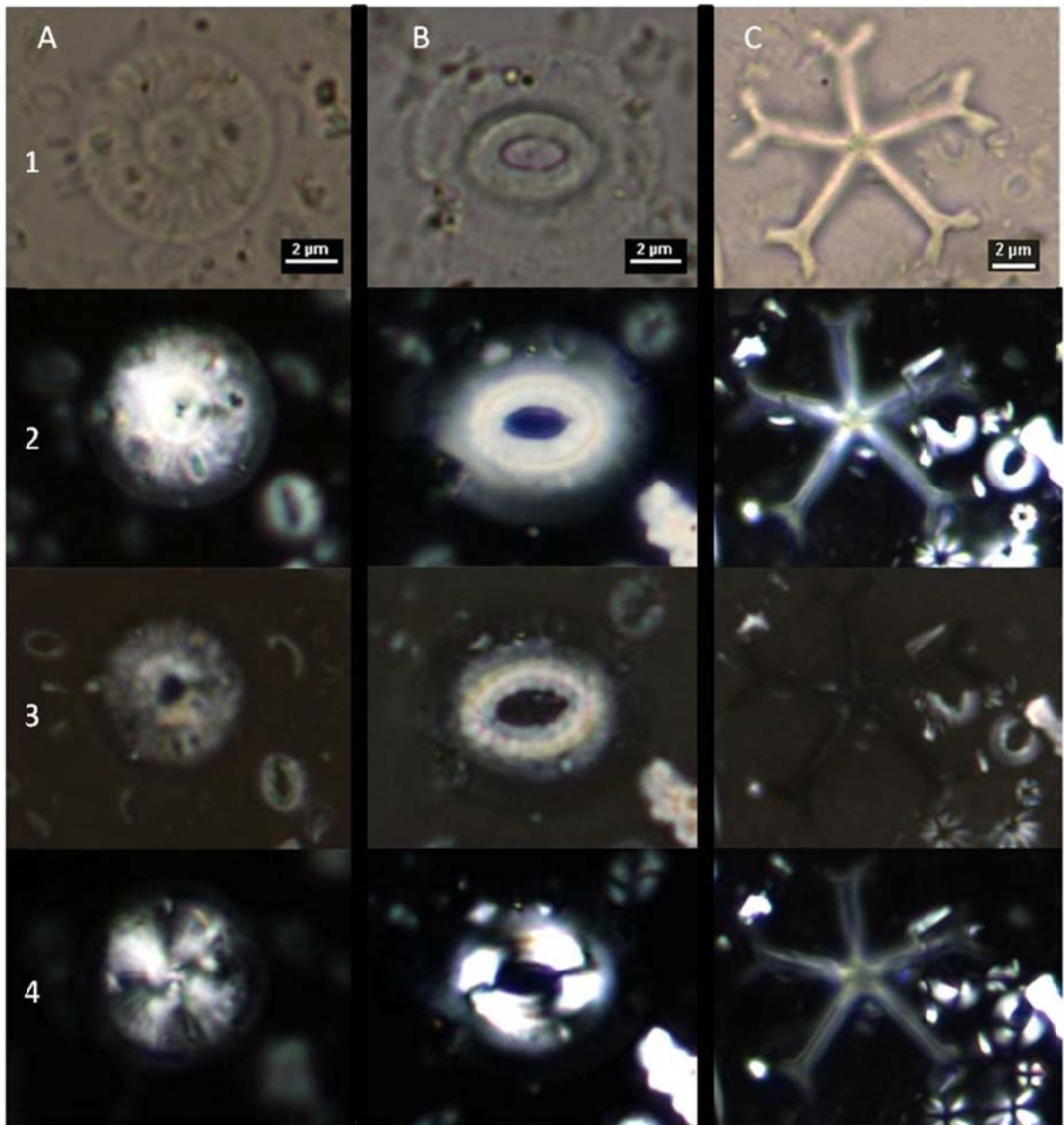


Fig. 3.2 Comparación entre imágenes de *Calcidiscus leptoporus* (Columna A), *Coccolithus pelagicus* (Columna B) y *Discoaster* (Columna C) tomadas con diferentes configuraciones del microscopio: En la primera fila se muestra iluminadas en campo claro, sin utilizar polarizadores. En la segunda fila se muestran iluminadas con luz polarizada circular con condensador, y en la tercera fila se muestran iluminadas con luz polarizada circular pero eliminando el efecto del condensador. En la última fila se muestran iluminadas con luz polarizada lineal y con condensador. Nótese cómo, en la segunda fila, las unidades V de *C. leptoporus* y *C. pelagicus*, y el *Discoaster* completo se muestran oscuros al ser iluminados con luz paralela al eje óptico.

Ventajas y aplicaciones de la polarización circular

Al observarlos utilizando luz polarizada circular en lugar de lineal la imagen de los cocolitos y otros nanofósiles calcáreos tiene distintas propiedades, lo que supone una ventaja en algunos casos:

- No se produce la extinción total de los pequeños nanolitos, sea cual sea la orientación de la platina.

Un ejemplo de este caso lo constituyen los nanolitos de *Florisphaera profunda*: al estar formados por cristales sencillos cuyo eje óptico está prácticamente contenido en su plano, su brillo cuando se observa con luz polarizada lineal depende de la orientación respecto a los ejes de los polarizadores lineales, por lo que varía desde un máximo hasta ser prácticamente cero, resultando indetectables. Por ello el observador está obligado a rotar la platina para poder observar todos los nanolitos de *Florisphaera* o, si se trata de un sistema automático, tomar varias fotografías en distintos ángulos, para luego compararlas entre sí.

Si se emplea luz polarizada circular, todos los nanolitos de este tipo pueden ser detectados y medidos en una sola imagen. El observador no necesita rotar la platina y, en el caso de un análisis automático, no es necesario tomar varias imágenes para luego compararlas entre sí (figura 3.3).

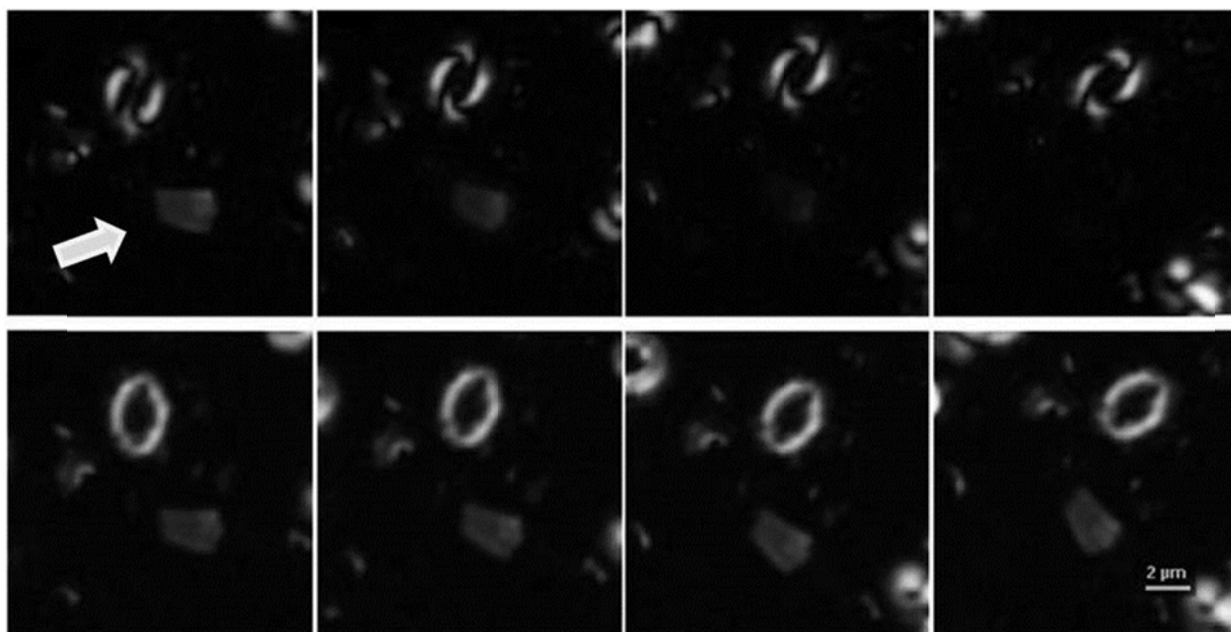


Fig. 3.3 El mismo campo visual observado con luz polarizada lineal (fila superior) y con luz polarizada circular (fila inferior), con la platina rotada a 0° , 15° , 30° y 45° (Columnas primera a cuarta respectivamente). Cuando se utiliza luz polarizada lineal el nanolito de *Florisphaera profunda*, señalado inicialmente con una flecha, va variando su intensidad hasta llegar a ser indetectable cuando el ángulo es de 45° . Sin embargo si se utiliza luz polarizada circular su brillo permanece constante independientemente del ángulo.

- La forma e intensidad de los cocolitos es independiente del ángulo de rotación

Al observarlos con luz polarizada lineal, la forma de los cocolitos radiales varía ligeramente, y la intensidad de luz depende de la orientación de la platina, por lo que zonas con características morfométricas similares se observan con distinta intensidad lumínica, llegando incluso a oscurecerse totalmente, lo que origina figuras en forma de cruz, con zonas alternas de intensidad máxima y mínima.

El uso de luz polarizada circular hace que el brillo y color de cada cocolito dependa únicamente de sus características morfológicas, y todas las estructuras similares son visibles con la misma intensidad (figuras 3.4, 3.6 y 3.7). Esto hace que las mediciones biométricas se puedan realizar sobre una única imagen de la muestra, al aparecer tanto las estructuras internas como los bordes claramente definidos.

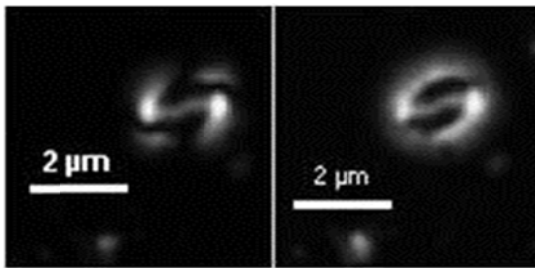


Fig. 3.4 Pequeño cocolito de *Gephyrocapsa*. La longitud, ancho y ángulo del puente pueden ser medidas de una forma más precisa si se utiliza luz polarizada circular (derecha) en lugar de lineal (izquierda).

Además, los sistemas automáticos de identificación y medición se pueden ver beneficiados del uso de luz polarizada circular, ya que el contorno del cocolito es continuo y claramente visible, facilitando su detección automática utilizando algoritmos basados en variaciones de intensidad (figura 3.5).

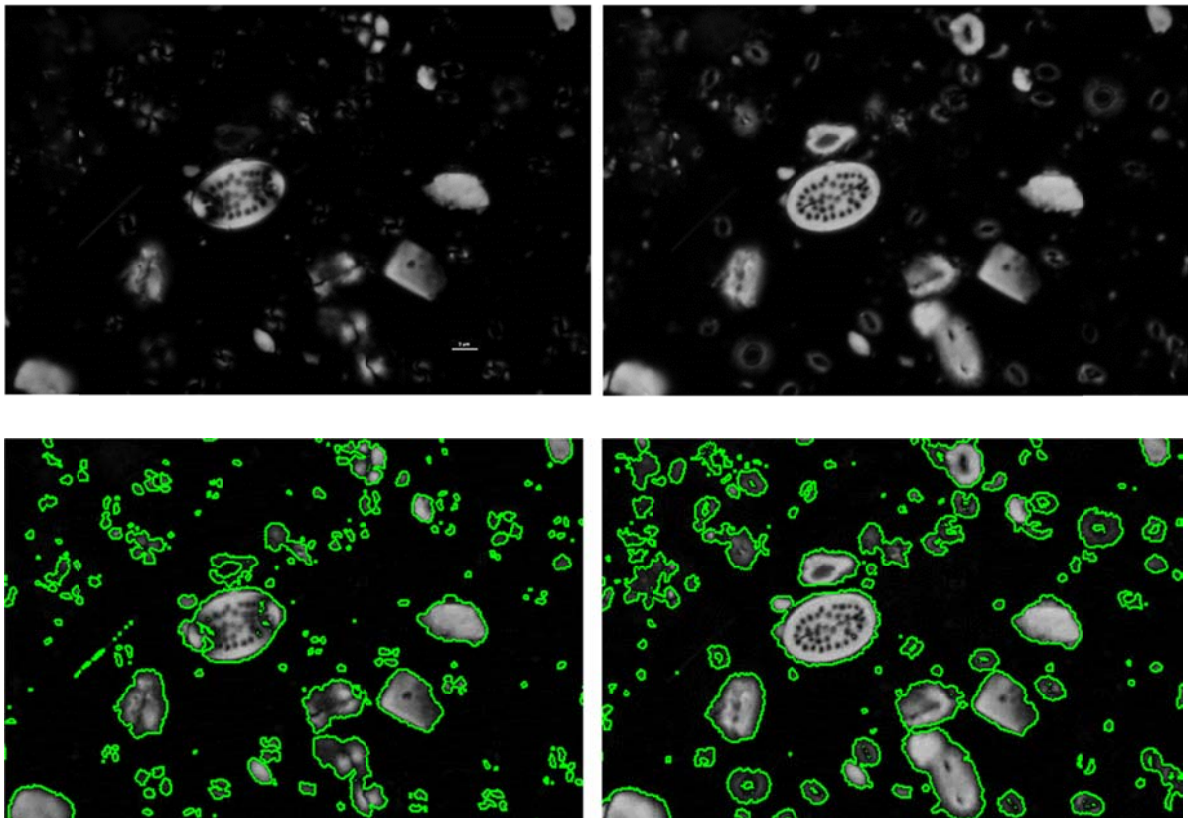


Fig. 3.5 Comparación de imágenes del mismo campo visual tomadas con polarización lineal (izquierda) y circular (derecha). En la fila inferior se muestra la detección automática de bordes basada en un valor umbral de gris.

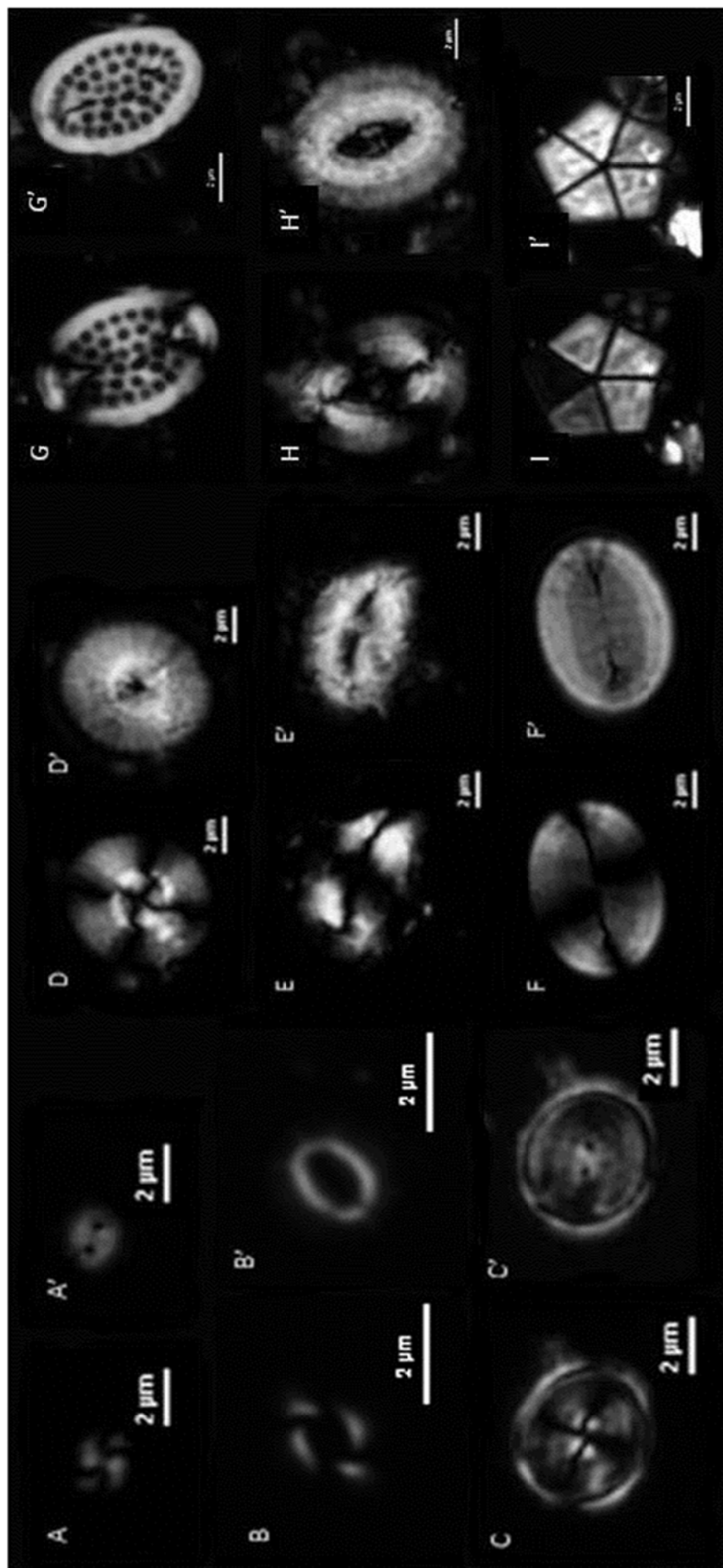


Fig. 3.6 Comparación de imágenes de cocolitos tomadas con luz polarizada lineal (A – I) y circular (A' – I') : A) small *Gephyrocapsa*, B) *Emiliania huxleyi*, C) *Syracosphaera* spp., D) *Calcidiscus leptoporus*, E) *Helicosphaera carteri*, F) *Pontosphaera discopora*, G) *Pontosphaera multipora*, H) *Coccolithus pelagicus*, I) *Braarudosphaera bigelowii*.

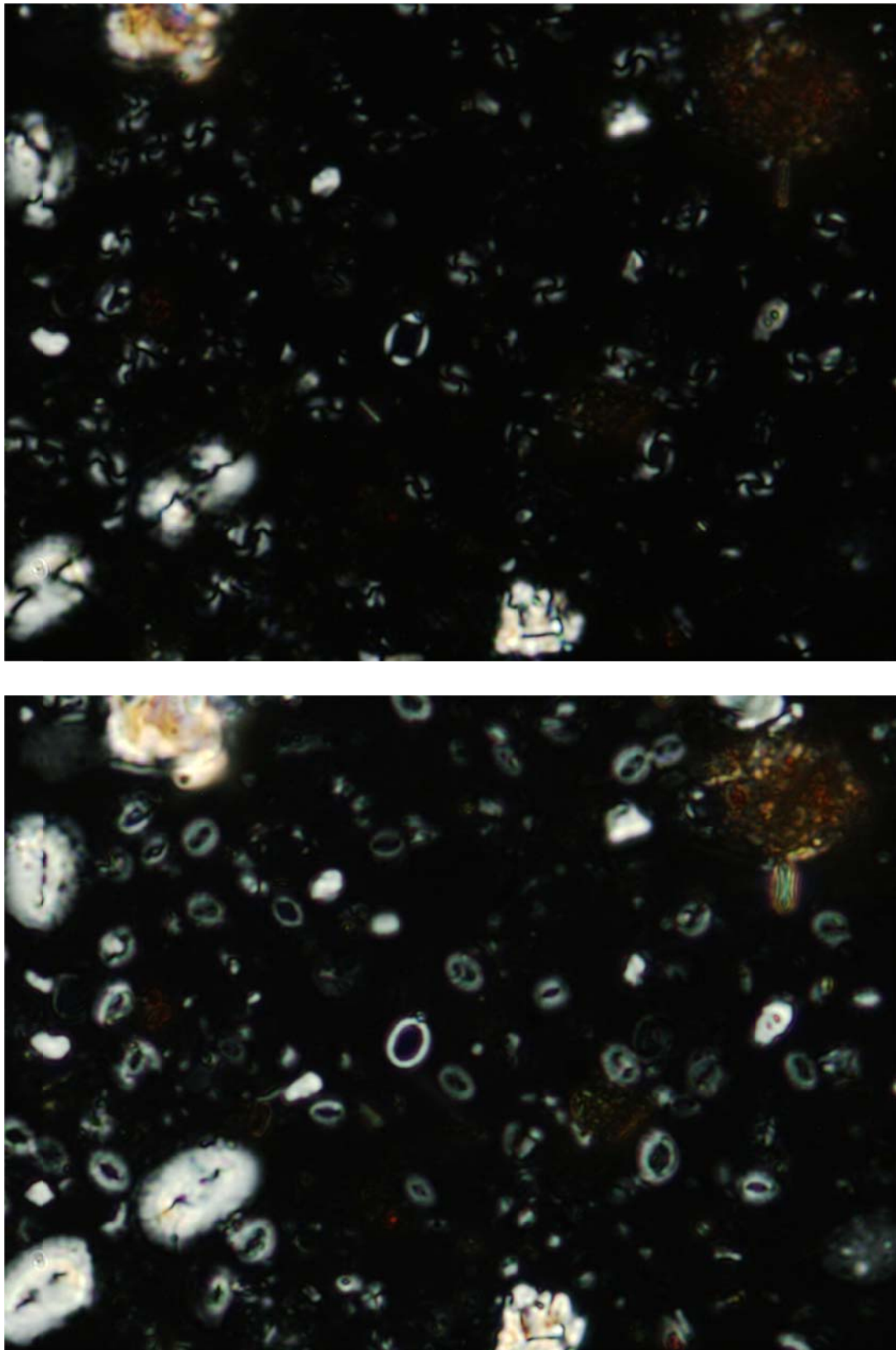


Fig. 3.7 Comparación de imágenes del mismo campo visual tomadas con polarización lineal (superior) y circular (inferior).

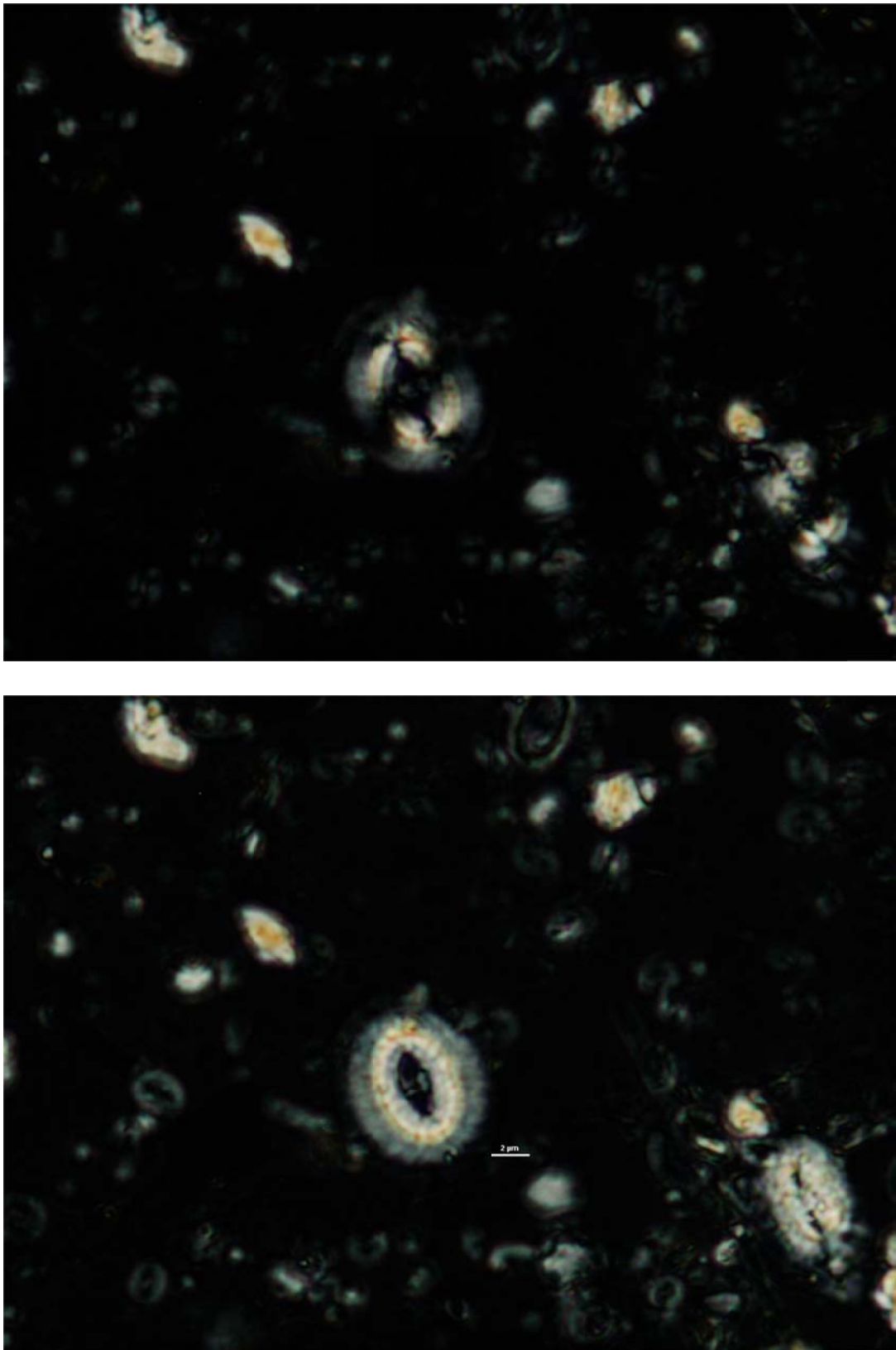


Fig. 3.7 (continuación) Comparación de imágenes del mismo campo visual tomadas con polarización lineal (superior) y circular (inferior).

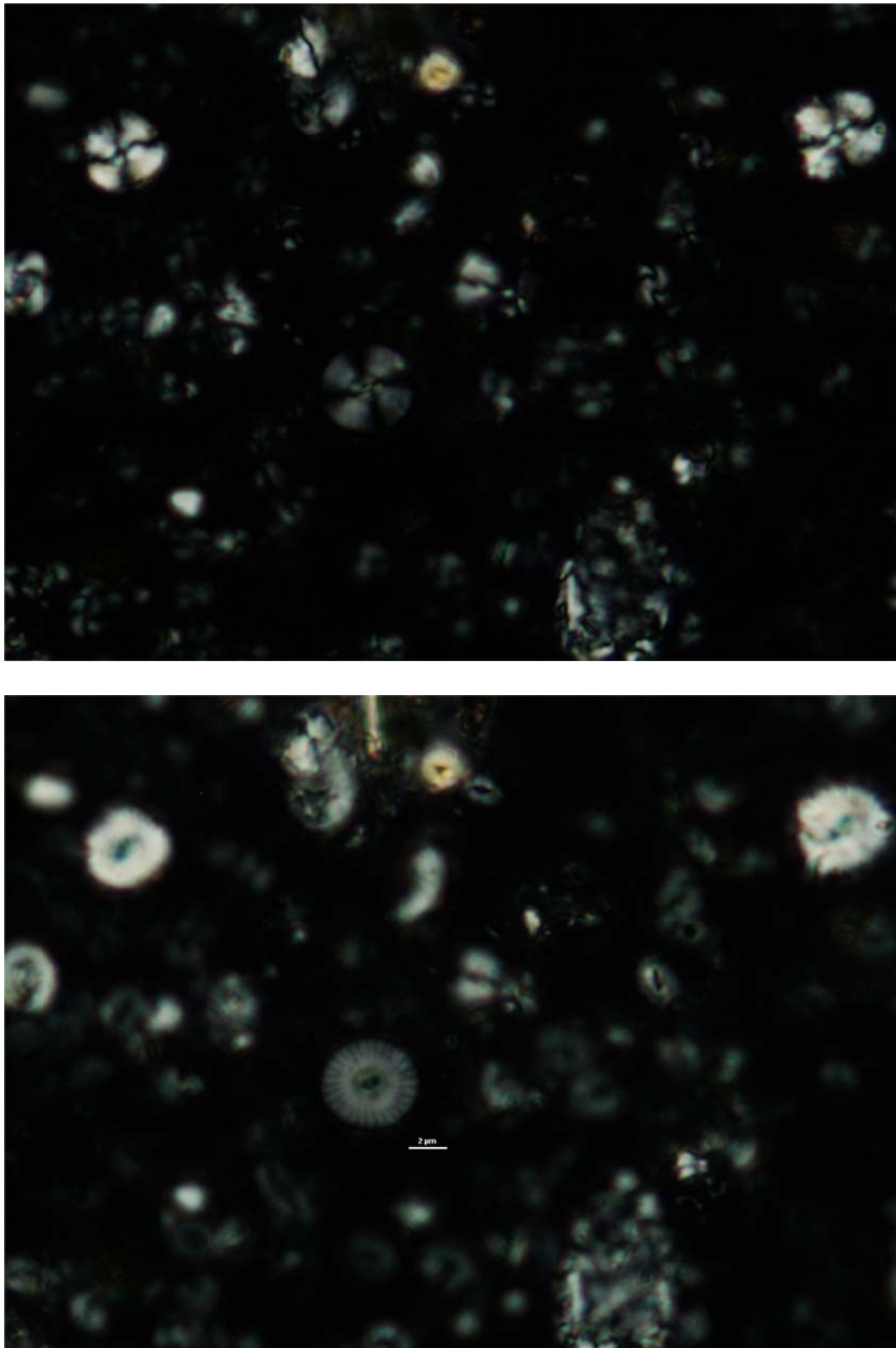


Fig. 3.7 (continuación) Comparación de imágenes del mismo campo visual tomadas con polarización lineal (superior) y circular (inferior).

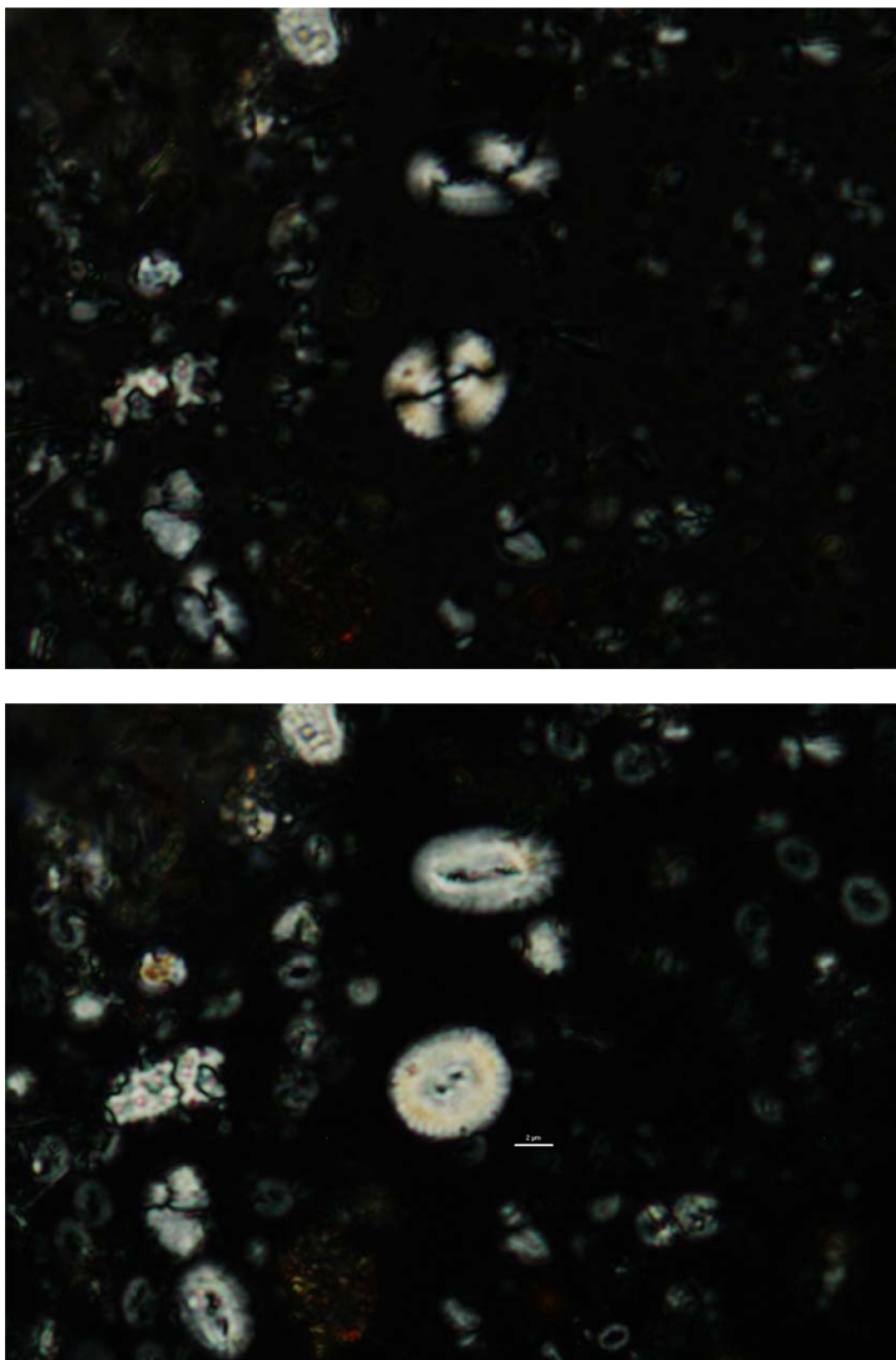


Fig. 3.7 (continuación) Comparación de imágenes del mismo campo visual tomadas con polarización lineal (superior) y circular (inferior).

- El uso de luz polarizada circular, junto con la iluminación oblicua hace que todo el cocolito sea visible.

La visibilidad de las unidades tipo V, o de nanolitos como los de Discoaster varía al variar la apertura numérica del condensador, llegando incluso a desaparecer si el condensador se elimina del sistema (algunos condensadores incluyen una lente móvil que permite iluminar directamente con rayos paralelos al eje del microscopio, por lo que el efecto es similar y no es necesario quitar todo el sistema de lentes). De esta forma se pueden identificar fácilmente las unidades cristalinas tipo V de los cocolitos y nanolitos como los de Discoaster (figura 3.2).

Entre las aplicaciones de la luz polarizada circular está el hecho de que, a partir del análisis de una única imagen de un cocolito se pueda hacer una estimación de su volumen, su masa y su espesor en cada punto. Esta aplicación es de gran importancia ya que, debido a su pequeño tamaño, los cocolitos no se han podido aislar individualmente para poder medir analíticamente su masa y su espesor.

El mismo principio se puede aplicar para determinar la cantidad de carbonato debido a cocolitos presente en toda la muestra y, si esta ha sido preparada de manera homogénea, estimar el flujo total de carbonato debido a cocolitos.

Hasta ahora, varios métodos habían sido propuestos para medir la cantidad de calcita debida a cocolitos presente en una muestra:

El método más sencillo consiste en medir la fracción más fina de sedimento en bruto, asumiendo que dicha fracción está formada por entero de cocolitos (Broerse et al., 2000). Se trata de un método bastante impreciso pues esa fracción está formada no sólo por cocolitos, sino también por otras partículas como arcilla, microfósiles silíceos o fragmentos de foraminíferos.

Otro método consiste en estimar la masa de cada cocolito a partir de la geometría de un cocolito idealizado (Young y Ziveri, 2000). La cantidad total de carbonato puede estimarse multiplicando el número total de cocolitos de cada especie por la masa estimada de un cocolito ideal. Este método puede tener en cuenta el tamaño de cada cocolito, pero no variaciones debidas a factores como el grado de calcificación o la disolución.

Por último, el tercer método existente para calcular la masa de un cocolito está basado en las propiedades ópticas de la calcita. Ya que el color y la intensidad de gris de un cocolito observado con un microscopio polarizador están relacionado con su espesor, el volumen de un cocolito puede estimarse a partir de una fotografía tomada con una cámara digital, midiendo el área y el nivel de gris correspondiente a cada pixel que forma la imagen y asignándole un espesor determinado. Esta técnica fue originariamente propuesta por L. Beaufort (2005) utilizando imágenes tomadas con luz polarizada lineal, lo que suponía ciertas limitaciones entre las que estaba el hecho de que el brillo de algunos microfósiles calcáreos, como *Florisphaera* depende de la orientación de la platina o el hecho de que en los cocolitos elípticos la figura varía con la orientación de la platina. Esta técnica fue modificada midiendo la luz únicamente en ciertas zonas del cocolito (Cubillos et al., 2012) o combinando digitalmente varias imágenes tomadas con diferentes orientaciones de los polarizadores lineales, lo que requería un sistema más complejo y el posterior tratamiento digital de cada imagen (Beaufort et al., 2011).

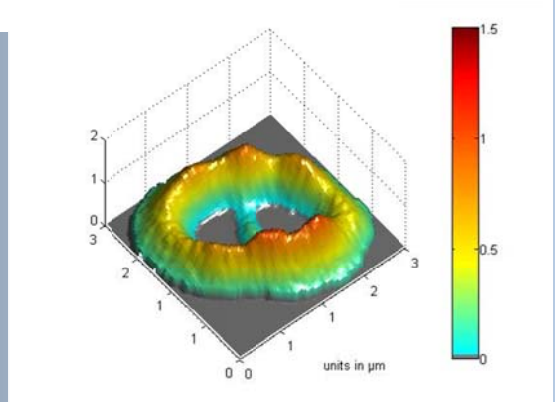
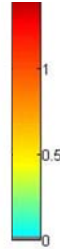
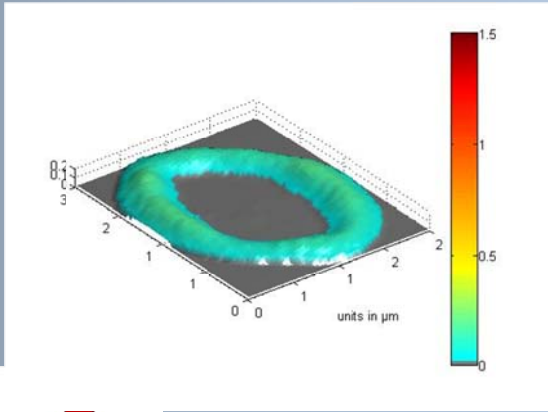
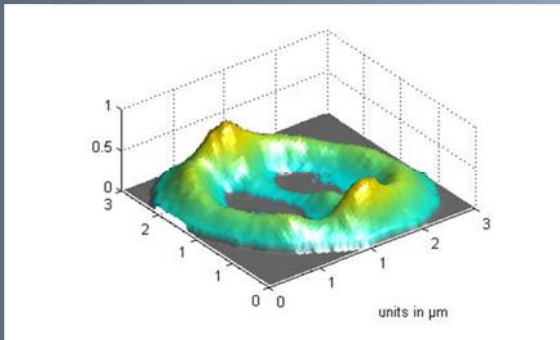
Este último método se mejora sensiblemente al emplear luz polarizada circular en lugar de lineal. Dada la importancia que tiene el conocer la masa individual de cada cocolito, sus variaciones en espesor y calcificación, y la cantidad de carbonato debido a cocolitos que forma parte de un sedimento, en los capítulos siguientes del presente trabajo de centrarán en estas ventajas y su aplicación el estudio de sedimentos reales.

Bibliografía

- Beaufort, L., 2005. Mass estimates of coccoliths using the optical properties (birefringence) of calcite. *Micropaleontology* 51, 289-297.
- Beaufort, L., Su, X., de Garidel-Thoron, T., Barbarin, N. y Gally., Y., 2011. Collapse of coccolith calcification after 1940 recorded in a 500-years long time series (core MD05-2917 – Western Pacific) with a yearly resolution, *Journées de Paléocéanographie IMAGES-France*. CEREGE. CCSd (Centre pour la Communication Scientifique Directe).
- Billard, C., y Inouye, I., 2004. What is new in coccolithophore biology? En: Thierstein, H.R. y Young, J. R., eds. *Coccolithophores: from molecular processes to global impact*. Springer Berlin Heidelberg, 1-29.
- Cubillos, J.C., Henderiks, J., Beaufort L., Howard W.R. y Hallegraeff G.M., 2012, Reconstructing calcification in ancient coccolithophores: Individual coccolith mass and morphology of *Coccolithus pelagicus* (sensu lato), *Marine Micropaleontology*, 92-93 (2012),29-39.
- Cuif, J.P., Dauphin, Y. y Sorauf, J.E., 2010. *Biominerals and fossils through time*. Cambridge University Press.
- Douglas, B.M. y Davidson, M.W., 2012. *Fundamentals of Light Microscopy and Electronic Imaging*, 2nd Edition. Wiley-Blackwell.
- Flores, J.A., y Sierro, F.J., 2007. Paleooceanography, biological proxies: Coccoliths. En: Scott, E.A., ed. *Encyclopedia of Quaternary Science*. Amsterdam: Elsevier, 1634-1647.
- Gribble, C.D., 2012. *Optical Mineralogy: Principles and Practice*. Springer.

- Hecht, E., 2015. Optics, 5ª ed. Pearson Education.
- Henriksen, K., Young, J.R., Bown, P.R. y Stipp, S.L.S., 2004. Coccolith biomineralisation studied with atomic force microscopy. PALAEONTOLOGY, 47 725 – 743
- Hibberd, D.J., 1976. The ultrastructure and taxonomy of the Chrysophyceae and Prymnesiophyceae, Haptophyceae.: survey with some new observations on the ultrastructure of the Chrysophyceae. Botanical Journal of the Linnean Society 72: 55-80.
- Honjo, S., 1976. Coccoliths: Production, transportation and sedimentation. Marine Micropaleontology 1: 65-79.
- Kameo, K. y Furukawa, N., 2007. Analysis of crystallographic directions in *Florisphaera profunda*, *Braarudosphaera bigelowii* and Neogene discoasters: preliminary report on nannolith crystallography, J. Nanoplankton Res. 29, 1., pp.19-23
- Keller, M.D., 1989. Dimethyl Sulfide Production and Marine Phytoplankton: The Importance of Species Composition and Cell Size. Biological Oceanography 6: 375-382.
- Kiermayer, O. y Romanovicz, D.K., 1981. Scale Formation in Flagellates. Cytomorphogenesis in Plants. Springer Vienna, 27-62.
- Lloyd, G.T., Smith, A.B. y Young, J.R., 2011. Quantifying the deep-sea rock and fossil record bias using coccolithophores. Geological Society, London, Special Publications 358: 167-177.
- Malin, G y Erst, G.O., 1997. Algal production of dimethyl sulfide and its atmospheric role. Journal of Phycology 33: 889-896.
- Murphy, D.B., 2012. Fundamentals of Light Microscopy and Electronic Imaging. Wiley.
- Naka, K., ed., 2007. Biomineralization I: Crystallization and Self-Organization Process. Springer.
- Pienaar, R.N., 1994. Ultrastructure and calcification of coccolithophores. En: Winter, A. y Siesser, W., eds. Coccolithophores. Cambridge: Cambridge University Press, 13-37.
- Tegethoff, F.W., Rohleder, J., y Kroker, E., 2001. Calcium carbonate: from the Cretaceous period into the 21st century. Springer Science & Business Media.
- Thierstein, H.R. y Young, J.R., 2013. Coccolithophores: From Molecular Processes to Global Impact. Springer.

- Török, P. y Kao, F.J., 2013. *Optical Imaging and Microscopy: Techniques and Advanced Systems*. Springer.
- Wayne, R., 2014. *Light and Video Microscopy*. Academic Press.
- Winter, A. y Siesser, W.G., 1994. *Coccolithophores*. Cambridge University Press., p.242.
- Young, J.R., 1994. Function of coccoliths. En: Winter A y Siesser WG, eds. *Coccolithophores*. Cambridge University Press, 63-82.
- Young, J.R. y Henriksen, K., 2003. Biomineralization Within Vesicles: The Calcite of Coccoliths. *Reviews in Mineralogy and Geochemistry* 54: 189-215.
- Young, J.R. y Ziveri, P., 2000. Calculation of coccolith volume and its use in calibration of carbonate flux estimates. *Deep-Sea Research Part II-Topical Studies in Oceanography* 47, 1679-1700.



Capítulo IV

Mediciones biométricas de cocolitos y comparación con técnicas anteriores

Capítulo IV: Mediciones biométricas de cocolitos y comparación con técnicas anteriores

Introducción

Ya que una de las principales aplicaciones de la polarización circular es la medición de la masa y el volumen de cocolitos individuales a partir de imágenes tomadas con una cámara digital, en el presente capítulo se pretende utilizar el programa C-Calcita para obtener valores de diversas especies de cocolitos y poderlos comparar con los obtenidos mediante otras metodologías.

Los resultados contenidos en el presente capítulo, junto con una breve descripción del programa C-Calcita y la configuración del microscopio necesaria para poder trabajar con polarización circular, fueron presentadas en el International Nannoplankton Association Meeting en septiembre de 2013 (Fuertes et al., 2013) y han sido publicados en el número 113 de la revista Marine Micropaleontology (doi: 10.1016/j.marmicro.2014.08.007) que se incluye como anexo del presente trabajo.

Metodología

Las muestras analizadas proceden del testigo MD 99-2343, obtenidas por el R/V Marion Dufresne durante la campaña IMAGES V. El testigo se obtuvo al norte de la isla de Menorca en el Mar Mediterráneo (40° 29,84' N, 4° 1,69' E), a una profundidad de 2391 m (figura 4.1).

Para poder comparar las estimaciones de masa obtenidas con otros estudios de especies modernas, únicamente se tomaron imágenes de las muestras correspondientes a la parte superior del testigo, a profundidades de 20 y 40 cm, correspondientes con edades inferiores a 1000 años (Sierro et al., 2005).

La asociación de cocolitóforos está dominada por small *Gephyrocapsa* y *Emiliana huxleyi* (<4 µm). Otras especies comunes son *Calcidiscus leptoporus*, *Oolithotus* spp., *Umbellosphaera* spp., *Umbilicosphaera* spp., *Helicosphaera carteri*, *Syracosphaera* spp., *Coccolithus pelagicus* y *Florisphaera profunda*. Otras especies, como *Braarudosphaera bigelowii*, *Pontosphaera* spp., y *Rhabdosphaera clavigera* también aparecen, pero con abundancias mucho menores. La preservación de las muestras es buena, con mínima disolución.



Fig. 4.1 Localización del testigo MD 99-2343 del que proceden las muestras analizadas

Las muestras fueron preparadas por decantación siguiendo el método de Flores y Sierro (1997), que crea una distribución homogénea de cocolitos, lo que permite no sólo la observación de los mismos sino también el cálculo de flujos.

Las imágenes fueron tomadas con una cámara Nikon DS-Fi1 controlada con el software Nis-Elements y acoplada a un microscopio Nikon Eclipse LV100 POL, con objetivo 100x H/N2 equipado con dos láminas $\lambda/4$ tal y como se ha descrito en el segundo capítulo.

Las imágenes se tomaron con la intensidad lumínica del microscopio constante a lo largo de cada sesión fotográfica, sin variar ninguno de los elementos que pueden alterar la cantidad de luz que llega a la muestra, o la intensidad capturada y registrada por la cámara después de pasar a través de la misma, como son el tiempo de exposición, la ganancia o correcciones de contraste y color.

Los valores de luz y apertura en el microscopio y los parámetros de control de la cámara se fijaron a niveles apropiados para que ninguna de las partes de los cocolitos a estudiar quede saturada.

Una imagen de una *Rhabdosphaera* fue tomada al inicio de cada sesión, para ser utilizada posteriormente como referencia a la hora de calibrar el espesor correspondiente con cada nivel de gris.

Una vez capturadas las imágenes mediante el programa Nis-Elements, fueron almacenadas sin comprimir para ser posteriormente analizadas con el programa C-Calcita.

La calibración de las distancias vertical y horizontal se realizó utilizando un micrómetro Leitz, dividiendo una longitud conocida entre el número de píxeles medidos en la imagen. De esta forma, con la configuración utilizada el área de cada píxel de la imagen equivale a $0.035 \mu\text{m}^2$.

Para realizar la calibración entre el nivel de gris y el espesor se utilizó una imagen de una *Rhabdosphaera* bien preservada y enfocada. Tras eliminar el nivel de gris correspondiente al ruido de fondo, midiendo el valor de gris en una zona vacía y restándosele a la imagen, se midió el nivel de gris en el punto medio de varias secciones transversales en las cuales se midió también su ancho. Al tener la sección de la *Rhabdosphaera* una forma circular, el ancho es el mismo que el espesor en el punto medio, por lo que el nivel de gris en el punto medio de cada sección corresponde con un espesor igual al ancho. Se realizó un ajuste lineal entre el nivel de gris y el espesor, siguiendo estudios previos que relacionaban de manera lineal ambas magnitudes (Beaufort, 2005; Cubillos et al., 2012). En el rango de espesores medidos, la relación se ajusta a una línea, y las secciones obtenidas concuerdan con las esperadas. (Figura 4.2).

Al depender la visibilidad de las unidades V de los heterococolitos, o de nanolitos como los *Discoaster* de la cantidad de rayos que inciden con cierto ángulo en el eje óptico de los cristales, inicialmente paralelo al eje óptico del microscopio, y al estar la cantidad de dichos rayos condicionada por el condensador, de manera ideal estas unidades necesitarían una calibración distinta. Al haber utilizado la misma calibración, se comete un error que no ha sido estudiado cuantitativamente y que sólo afecta a las unidades dichas anteriormente. Una mejora en la calibración de las unidades V se propone como línea de investigación futura.

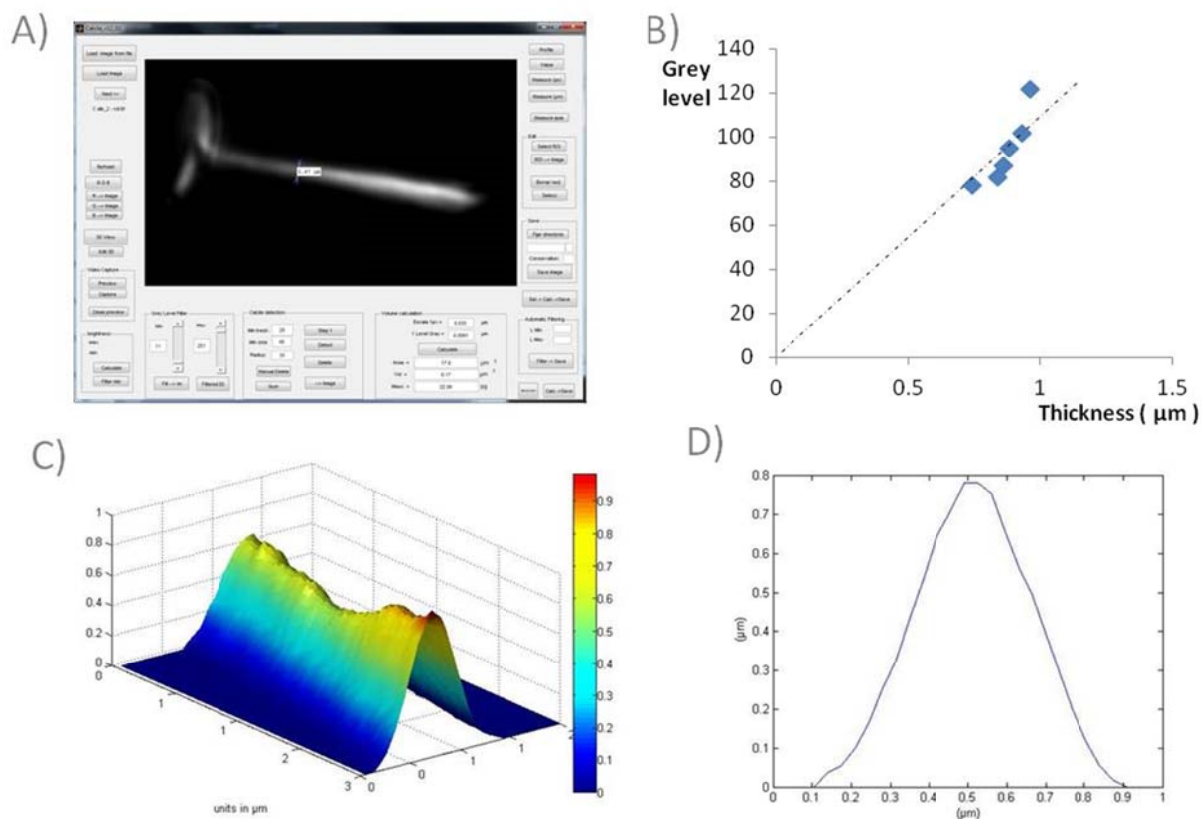


Fig. 4.2 Calibración del nivel de gris y el espesor correspondiente utilizando la imagen de una *Rhabdosphaera*. El ancho se puede medir directamente sobre la imagen, previamente calibrada, y el nivel de gris medido en el punto medio (A). Se realiza un ajuste entre el nivel de gris y el espesor (B). El volumen obtenido y el perfil (C) y (D) se corresponden con los de un cilindro, en los que su sección es circular.

Una vez que el programa ha sido calibrado, las imágenes son cargadas en C-Calcita, donde son convertidas a escala de grises y donde el usuario puede medir y eliminar el nivel de gris correspondiente al ruido de fondo y seleccionar el cocolito que desee medir. El programa automáticamente mide su eje mayor, eje menor, área, volumen y masa.

C-Calcita almacena los resultados junto con cada imagen medida, y los valores de masa, volumen, eje mayor y eje menor se pueden volcar a una hoja de cálculo Excel mediante una macro diseñada para tal fin.

Una vez en la hoja de cálculo, se calcula la circularidad (Henderiks, 2008) como:

$$\text{Circularidad} = \sqrt{\frac{L \cdot A}{L^2}}$$

Donde L es el largo (eje mayor) y A el ancho (eje menor)

Resultados

Los resultados obtenidos se muestran en la siguiente tabla:

Especie	Cocolitos medidos	Masa media (pg)	Desviación estandar	Longitud media (µm)	Ancho medio (µm)	Circularidad media (µm)
<i>Emiliana huxleyi</i>	138	2.61	0.98	3.22	2.50	0.88
Small <i>Gephyrocapsa</i> spp.	87	3.56	1.83	2.99	2.38	0.88
<i>Florisphaera profunda</i>	110	0.89	0.39	2.62	1.78	0.83
<i>Helicosphaera carteri</i>	143	98.42	34.09	8.83	5.59	0.80
<i>Rhabdosphaera clavigera</i>	41	16.84	5.96	11.89	2.77	0.48
<i>Syracosphaera</i> spp.	53	10.23	5.67	6.19	4.61	0.86
<i>Coccolithus pelagicus</i>	51	216.54	75.74	11.69	9.54	0.90

Análisis y comparación con otras técnicas

Ya que, debido a su pequeño tamaño la masa de un cocolito aún no ha sido medida de manera absoluta, únicamente se han podido realizar hasta la fecha estimaciones basadas en diversas metodologías. La comparación de los resultados obtenidos con estudios anteriores se muestra en la siguiente tabla:

Especie	Valor medio medido	Beaufort & Heussner (1999)	Young & Ziveri (2000)	Beaufort (2005)	Bollmann (2014)
	Mediterráneo (MD99-2343)	Mar Cantábrico	Atlántico Norte	Océano Índico	Mar Cantábrico / Atlántico Sur
<i>Emiliana huxleyi</i>	2.61	2.9	1.2-4.6	5.3	1.7 (Pequeños placolitos/ <i>Emiliana huxleyi</i>)
Small <i>Gephyrocapsa</i> spp.	3.56	5.81	3.6 (<i>G. ericsonii</i>)- 8.0(<i>G. muellerae</i>)	-	
<i>Florisphaera profunda</i>	0.89	6.8	1.3	2.2	1.0
<i>Helicosphaera carteri</i>	98.4	143	135	142	57.1
<i>Rhabdosphaera clavigera</i>	16.8	46	67.5		
<i>Syracosphaera</i> spp.	10.2	12	13.5 (<i>S. pulchra</i>)	10-22	5.9
<i>Coccolithus pelagicus</i>	216.5	151	398 (large) - 99 (small)		111.3

Los resultados obtenidos en el presente trabajo son consistentes con los obtenidos en estudios anteriores. La comparación con Young y Ziveri (2000) es particularmente interesante porque ellos usan una metodología totalmente diferente para calcular la masa de los cocolitos individuales: calculan el volumen de cada cocolito a partir de un factor llamado factor de forma, k_s . Los valores de este factor se calculan a partir de reconstrucciones de las secciones geométricas ideales de cada especie, en cuyo caso el volumen se puede calcular a partir de la longitud del eje mayor como:

$$Volumen = k_s L^3$$

La masa se puede calcular multiplicando el volumen por la densidad de la calcita, 2,7 g/cm³.

Si se comparan las masas individuales de cada cocolito utilizando la metodología de Young y Ziveri calculadas a partir de los valores de longitud del eje mayor medidos con el programa C-Calcita con los valores de masa obtenidos utilizando la metodología de escala de grises en imágenes obtenidas con polarización circular, los resultados están fuertemente correlacionados, como se aprecia en la siguiente tabla. Se trata de un resultado destacable, ya que la metodología de Young y Ziveri se basa en la geometría ideal de los cocolitos, mientras que el método utilizado en el presente estudio se basa en las propiedades ópticas de la calcita.

Especie	Coefficiente de correlación
<i>Emiliana huxleyi</i>	0.64
<i>Gephyrocapsa oceanica</i>	0.71
<i>Florisphaera profunda</i>	0.67
<i>Helicosphaera carteri</i>	0.92
<i>Rhabdosphaera clavigera</i>	0.61
<i>Syracosphaera</i> spp.	0.45
<i>Coccolithus pelagicus</i>	0.92

De manera general, la masa de los cocolitos está relacionada con la longitud elevada al cubo multiplicada por un valor constante llamado factor de forma (Young y Ziveri, 2000). La representación de ambas magnitudes medidas con el programa C-Calcita pone de manifiesto esta relación (figura 4.3).

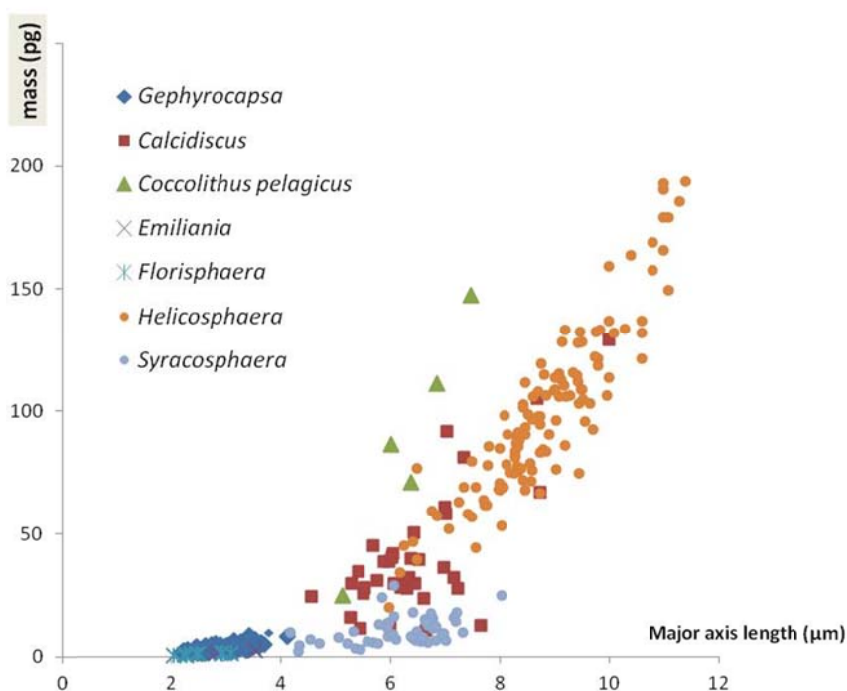


Fig. 4.3 Eje mayor de diferentes especies de cocolitos frente a su masa medida. El gráfico es similar al de una función cúbica del tipo $y = a x^3$

La metodología empleada en el presente estudio puede ser también comparada con la del factor de forma con otra aproximación diferente a la de las correlaciones entre ambas: los valores de la constante k_s se pueden calcular, no a partir de la reconstrucción basada en las secciones geométricas de los cocolitos, como hicieron Young y Ziveri, sino matemáticamente utilizando una regresión cúbica a partir de los valores medidos de masa y longitud con el programa C-Calcita.

Los valores obtenidos para cada especie realizando una regresión cúbica, comparados con los basados en modelos geométricos de Young y Ziveri se muestran en la siguiente tabla:

Especie	Ks Calculada	Desviación estándar	Ks Young & Ziveri (2000)
<i>Emiliana huxleyi</i>	0.026	0.009	0.02
<i>Gephyrocapsa oceanica</i>	0.046	0.018	0.05
<i>Florisphaera profunda</i>	0.017	0.009	0.04
<i>Helicosphaera carteri</i>	0.049	0.010	0.05
<i>Rhabdosphaera clavigera</i>	0.003	0.001	0.025
<i>Syracosphaera</i> spp.	0.014	0.009	0.015 (small)
<i>Coccolithus pelagicus</i>	0.044	0.008	0.06

Comparación de los valores de k_s obtenidos realizando un ajuste cúbico de los valores medidos utilizando polarización circular y medidas de masa basadas en el nivel de gris con los valores estimados por Young y Ziveri (2000) basándose en modelos geométricos.

Como ejemplo, en la figura 4.4 se muestra la representación de la masa medida y de la estimada con la metodología de Young y Ziveri, para el caso de *Helicosphaera Carteri*, y en la figura 4.5 se muestra su ajuste a una función cúbica.

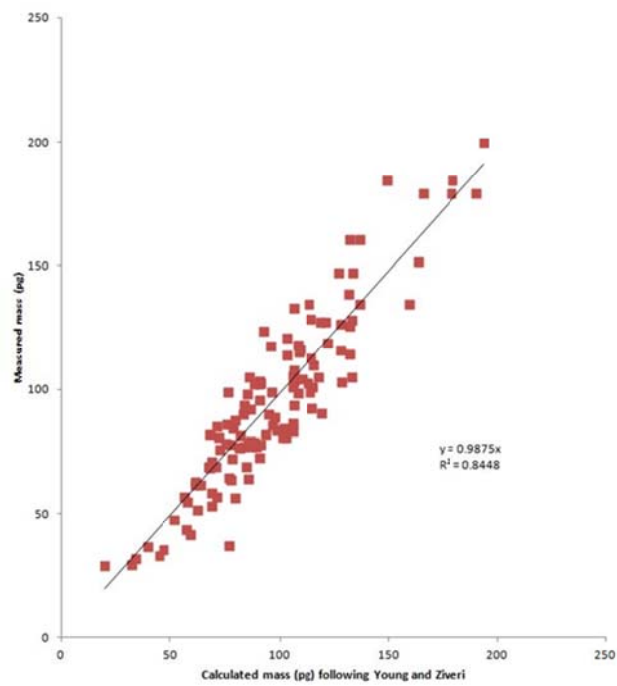


Fig. 4.4 Comparación entre la masa medida y de la estimada con la metodología de Young y Ziveri para el caso de *Helicosphaera carteri*.

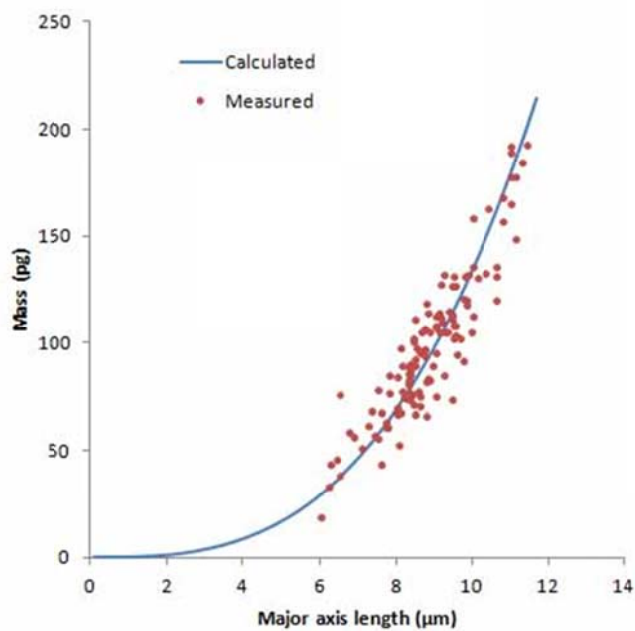


Fig. 4.5 Ajuste a una función cúbica (línea azul) de los valores medidos para los cocolitos de *Helicosphaera carteri*.

Los valores obtenidos para el factor de forma tienen una alta concordancia con los obtenidos por Young y Ziveri, a pesar de que ellos estimaban un margen de error de +/- 20 % para su metodología. La mayor diferencia entre ambos es en caso de la *Rhabdosphaera*, cuya masa medida es menor que la obtenida en su estudio.

La concordancia entre ambas metodologías no implica que una sea sustituible por la otra, ya que mientras la metodología de Young y Ziveri estima su masa en relación con su longitud, presuponiendo una forma geométrica “ideal” de cada cocolito, y trata a todos los de la misma especie por igual, la metodología basada en la medición del nivel de gris de imágenes tomadas utilizando polarización circular es una medida real de cada cocolito en particular, por lo que puede dar información sobre variaciones de masa de cocolitos con un tamaño similar.

Utilizando también polarización circular (Bollmann 2014) presenta mediciones de masa de cocolitos individuales. La comparación entre los resultados obtenidos en el presente estudio y los de Bollmann se muestran en la tabla de la página 113 y en la figura 4.6. Los valores obtenidos son en general similares, teniendo en cuenta las diferencias entre las longitudes medias de los cocolitos en ambos estudios, si bien, como se muestra en la figura, la masa obtenida para algunas especies como *H. Carteri* o *C. pelagicus* es ligeramente menor utilizando nuestra metodología. Estas discrepancias podrían ser debidas a las diferentes condiciones geográficas, o al hecho de que el escaso número de cocolitos medidos por Bollmann para algunas especies y su gran desviación estándar hace que sus resultados puedan no ser representativos.

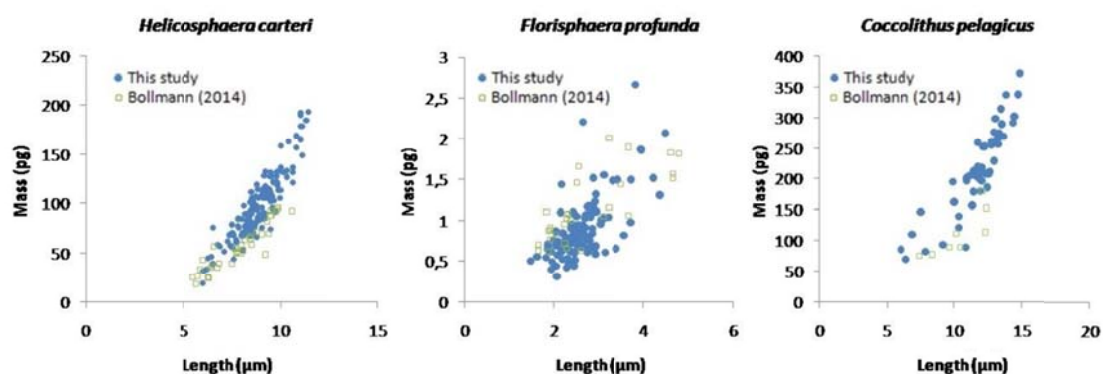


Fig. 4.6 Comparación de los resultados obtenidos con los publicados por Bollmann (2014) para algunas especies representativas.

Bibliografía

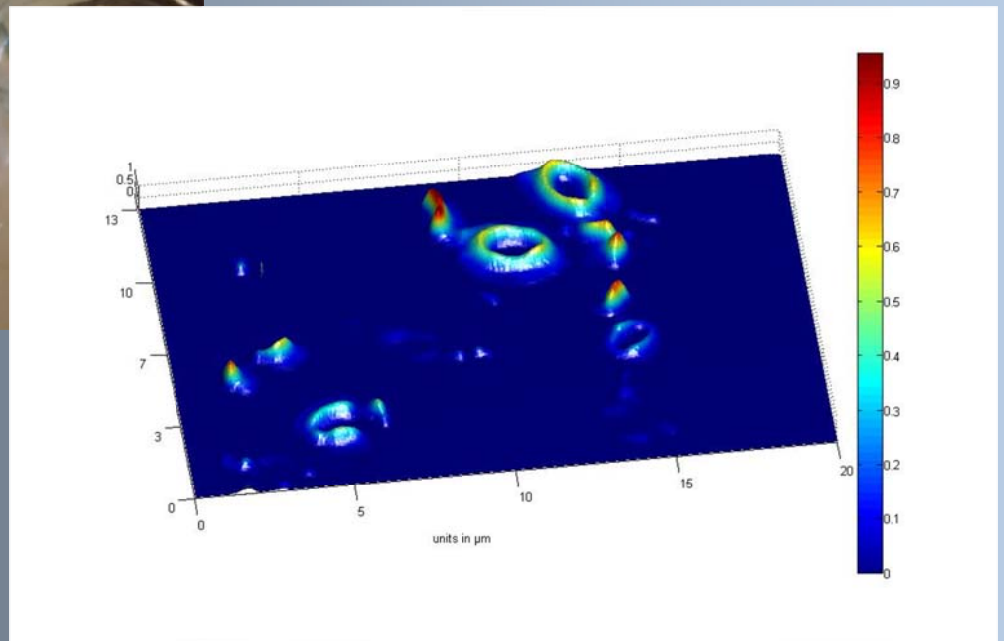
- Archer, D., Winguth, A., Lea, D. y Mahowald, N., 2000. What caused the glacial- interglacial atmospheric $p\text{CO}_2$ cycles? *Review of Geophysics*, 38(2), 159-189.
- Beaufort, L., 2005. Mass estimates of coccoliths using the optical properties (birefringence) of calcite. *Micropaleontology* 51, 289-297.
- Beaufort, L. y Dollfus, D., 2004. Automatic recognition of coccoliths by dynamical neural networks, *Marine Micropaleontology.*, 51, 57-73.
- Beaufort, L. y Heussner, S., 1999, Coccolithophorids on the continental slope of the Bay of Biscay-production, transport and contribution to mass fluxes. *Deep Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography* 46, 2147-2174.
- Beaufort, L., Probert, I., de Garidel-Thoron, T., Bendif, E.M., Ruiz-Pino, D., Metzl, N., Goyet, C., Buchet, N., Coupel, P., Grelaud, M., Rost, B., Rickaby, R.E.M. y de Vargas, C., 2011a. Sensitivity of coccolithophores to carbonate chemistry and ocean acidification, *Nature*, 476, 80–83.
- Beaufort, L., Su, X., de Garidel-Thoron, T., Barbarin, N. y Gally, Y., 2011b. Collapse of coccolith calcification after 1940 recorded in a 500-years long time series (core MD05-2917 – Western Pacific) with a yearly resolution, *Journées de Paléocéanographie IMAGES-France*. CEREGE. CCSd (Centre pour la Communication Scientifique Directe).
- Beaufort, L., Barbarin, N., y Gally, Y., 2014. Optical measurements to determine the thickness of calcite crystals and the mass of thin carbonate particles such as coccoliths, *Nature Protocols*, 9, 633–642, doi:10.1038/nprot.2014.028.

- Berger, W.H. y Roth, P.H., 1975. Oceanic micropaleontology: Progress and prospects. Review of Geophysics Space Physics, 13,561-585.
- Bollmann, J., 2014. Technical Note: Mass approximation of coccoliths using a circular polarizer and interference colour derived retardation estimates – (The CPR Method), Biogeosciences, 11, 1899-1910, doi:10.5194/bg-11-1899-2014.
- Born, M. y Wolf, E., 1980, Principles of Optics. 6 ed. Elmsford, N.Y.: Pergamon Press.
- Buitrago, Y.M., Flores, J.A. y Sierro, F.J., 2010. Calcareous nannofossils Upper Miocene biostratigraphy and biochronology at western equatorial Atlantic (ODP Site 999), Revista Espanola de Micropaleontologia, 42 (3), 2010, . 301-31.
- Broerse, A.T.C., Ziveri, P. y Honjo, S., 2000. Coccolithophore (CaCO₃) flux in the Sea of Okhotsk: seasonality, settling and alteration processes, Marine Micropaleontology, 39 (1-4), 179-200.
- Cubillos, J.C., Henderiks, J., Beaufort L., Howard W.R. y Hallegraeff G.M., 2012. Reconstructing calcification in ancient coccolithophores: Individual coccolith mass and morphology of *Coccolithus pelagicus* (sensu lato), Marine Micropaleontology, 92-93 (2012), 29-39.
- Delly, J.G., 2008, Essentials of Polarized Light Microscopy, College of Microscopy
- Flores, J.A. y Sierro, F.J., 1997. Revised technique for calculation of calcareous nannofossil accumulation rates. Micropaleontology, 43(3), 321-324.
- Frigola, J., Moreno, A., Cacho, I., Canals, M., Sierro, F.J., Flores, J.A. y Grimalt, J.O., 2008. Evidence of abrupt changes in Western Mediterranean Deep Water circulation during the last 50 kyr: A high-resolution marine record from the Balearic Sea. Quaternary International, 181, 88- 104.
- Fuertes, M.A., Flores, J.A. y Sierro, F.J., 2013. A new technique for observing calcareous nannofossils: methodology and application. (Oral presentation at International Nannoplankton Association, 15–19 September 2013, Reston, Virginia, USA). Abstract in Journal of Nannoplankton Research. 33, 59 (2013)
- Fuertes, M.A., Flores, J.A. y Sierro, F.J. 2014. The use of circularly polarized light for biometry, identification and estimation of mass of coccoliths. Marine Micropaleontology, 113 pp. 44–55 <http://dx.doi.org/10.1016/j.marmicro.2014.08.007>

- Halloran, P.R., Hall, I.R., Colmenero-Hidalgo, E. y Rickaby, R.E.M., 2008. Evidence for a multispecies coccolith volume change over the past two centuries: understanding a potential ocean acidification response. *Biogeosciences* 5, 1651-1655.
- Hecht, E., 2002. Optics, fourth edition. Addison Wesley.
- Henderiks, J., 2008. Coccolithophore size rules - Reconstructing ancient cell geometry and cellular calcite quota from fossil coccoliths. *Marine Micropaleontology*, 67, 1431-54.
- Kameo, K. y Furukawa, N., 2007. Analysis of crystallographic directions in *Florisphaera profunda*, *Braarudosphaera bigelowii* and Neogene *discoasters*: preliminary report on nannolith crystallography. *Journal of Nannoplankton Research*, 29 (1): 19-23.
- Kamptner, H., 1952. Das Mikroskopische Studium des Skelettes der coccolithineen. (Kalkflagellaten). *Mikroskopie* 7.
- Millot, C., 1999. Circulation in the western Mediterranean Sea, *Journal of Marine Systems*, 20.
- Murphy, D.B., 2001. Fundamentals of light microscopy and electronic imaging. Wiley - Liss, Inc.
- Saleh, Bahaa E.A. y Teich, Malvin Carl, 1991. Fundamentals of photonics. John Wiley&Sons, Inc.
- Sierro, F.J., Hodell, D.A., Curtis, J.H., Flores, J.A., Reguera, I., Colmenero-Hidalgo, E., Barcena, M.A., Grimalt, J.O., Cacho, I., Frigola, J. y Canals, M., 2005. Impact of Iceberg melting on Mediterranean thermohaline circulation. *Paleoceanography*. 20, 1-13.
- The Royal Society, 2005. Ocean Acidification Due to Increasing Atmospheric Carbon Dioxide. The Royal Society, London, UK.
- Young, J.R. y Henriksen, K., 2003. Biomineralization within vesicles: the calcite of coccoliths. P.M. Dove, J.J. De Yoreo & S. Weiner (Eds). *Biomineralization. Reviews in Mineralogy and Geochemistry*, 54, 189-215.
- Young, J.R., Didymus, J.M. y Mann, S., 1991. On the reported presence of vaterite and aragonite in coccoliths of *Emiliania huxleyi*, *Botanica Marina*, 34, 589-591.
- Young, J.R., Didymus, J.M., Bown, P.R., Prins, B. y Mann, S., 1992. Crystal assembly and phylogenetic evolution in heterococcoliths. *Nature*, 356: 516-518.

Young, J.R. y Ziveri, P., 2000. Calculation of coccolith volume and its use in calibration of carbonate flux estimates. *Deep-Sea Research Part II-Topical Studies in Oceanography*, 47, 1679-1700.

Wilbur, K. M. y Watabe, N., 1963. Experimental studies on calcification in mollusks and the alga *Coccolithus huxleyi*. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 109, 82-112.



Capítulo V

Estimación del flujo de carbonato debido a cocolitos en la zona del Frente Polar del Océano Austral

Capítulo V: Estimación del flujo de carbonato debido a cocolitos en la zona del Frente Polar del océano Austral

Introducción

De manera natural parte del CO₂ atmosférico es absorbido y disuelto por el océano, por lo que el aumento del CO₂ en la atmósfera, originado principalmente por la utilización antropogénica de combustibles fósiles, está haciendo que la cantidad de CO₂ presente en los océanos esté también aumentando. Se estima que una tercera parte del CO₂ liberado a la atmósfera por los seres humanos ha sido absorbido por los océanos (Sabine et al., 2004).

El CO₂ disuelto en el agua implica la formación de ácido carbónico ($\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O} \leftrightarrow \text{H}_2\text{CO}_3 \leftrightarrow \text{H}^+ + \text{HCO}_3^-$) lo que provoca una disminución de su PH, en el proceso conocido como acidificación oceánica (Caldeira y Wickett 2003). El ácido carbónico se disocia en iones de hidrógeno y de carbonato ($\text{H}_2\text{CO}_3 \leftrightarrow \text{H}^+ + \text{HCO}_3^- \leftrightarrow 2 \text{H}^+ + \text{CO}_3^{2-}$), y estos últimos se combinan con las moléculas de agua y de dióxido de carbono para producir iones de bicarbonato ($\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O} + \text{CO}_3^{2-} \leftrightarrow 2 \text{HCO}_3^-$). Por tanto, el aumento de CO₂ disuelto en el agua aumenta la acidez y disminuye la disponibilidad de iones de carbonato, necesarios para el proceso de calcificación

de gran cantidad de especies entre las que se encuentran los corales, moluscos, crustáceos y especies que forman el fitoplancton como los cocolitóforos.

En este contexto, es necesario conocer cómo cada especie en particular contribuye al ciclo del carbono y cómo responde a las variaciones de CO₂. En el caso de los cocolitóforos, su papel es de gran importancia porque, además de utilizar el carbono para producir compuestos orgánicos mediante la fotosíntesis ($6\text{CO}_2 + 6\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{C}_6\text{H}_{12}\text{O} + 6\text{O}_2$), lo utilizan también para la formación de sus cocolitos: en el proceso de calcificación dos iones de bicarbonato originan una molécula de carbonato de calcio y otra de CO₂ ($\text{Ca}^{2+} + 2\text{HCO}_3^- \rightarrow \text{CaCO}_3 + \text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O}$). Cuando los cocolitos se hunden redistribuyen el contenido oceánico de carbono, actuando globalmente como sumidero natural de CO₂, lo que controla también los niveles de CO₂ atmosférico. Por ello es importante conocer el flujo de carbonato debido a cocolitos que se sedimenta en el fondo oceánico.

Sin embargo, al sedimentarse los cocolitos se pueden mezclar con otras partículas de carbonato, y su pequeño tamaño hace imposible su separación analítica, pudiéndose medir mediante análisis químicos el contenido de carbonato de una fracción filtrada, pero sin poder separar qué parte se debe únicamente a cocolitos.

En el presente capítulo se propone el uso de luz polarizada circular, combinada con el cálculo de la masa de los cocolitos a partir de imágenes digitales de muestras preparadas por decantación, como método para poder calcular el flujo de carbonato debido únicamente a cocolitos. Con el fin de mostrar las ventajas y aplicaciones de la técnica, se ha probado en muestras de trampas de sedimentos recogidas en una zona de gran interés oceanográfico, como es el océano Austral.

El océano Austral es una de las regiones más importantes en el ciclo del carbono global, influyendo de manera significativa en el intercambio de CO₂ entre la atmósfera y el océano, representando el mayor sumidero de dióxido de carbono antropogénico (Gruber et al., 2009). Pero, pese a su gran importancia, las difíciles condiciones de trabajo en zonas polares hacen que las muestras disponibles para su estudio sean menores que en otras zonas del planeta, haciendo que la mayoría de conocimiento que tenemos sobre la distribución espacial y temporal del fitoplancton provenga de medidas y series aisladas, incompletas o derivadas indirectamente a partir de observaciones por satélite. En el presente trabajo se han analizado muestras de excepcional calidad recogidas en trampas de sedimentos en la zona del

Frente Polar del océano Austral, a 54 grados de latitud Sur, de gran interés por su amplia resolución temporal.

La importancia de poder conocer el flujo de carbonato debido a cocolitos ha hecho que en los últimos años se desarrollen varias metodologías para poderlo estimar de forma indirecta, entre las que destacan la propuesta por Young y Ziveri (2000), consistente en contar los cocolitos de cada especie presentes en una muestra para así calcular el flujo de cocolitos de cada especie y la contribución de cada una al flujo total de carbonato en base al volumen estimado de un cocolito “ideal”, pero sin tener en cuenta factores como variaciones en el espesor o disolución, o fragmentos de cocolitos difíciles de identificar. En el presente capítulo también se compararan los datos obtenidos con la técnica desarrollada con los obtenidos utilizando la metodología de Young y Ziveri, con el fin de contrastar los resultados y señalar las ventajas de la técnica propuesta.

Por tanto, los objetivos del presente capítulo son:

- Calcular el flujo de calcita debido a cocolitos a partir del análisis con el programa C-Calcita de imágenes tomadas utilizando luz polarizada circular de muestras recogidas en trampas de sedimentos y preparadas por decantación.
- Comparar los resultados obtenidos con las mediciones de carbonato total realizadas en laboratorio mediante análisis químicos.
- Comparar los resultados obtenidos con los que se obtendrían aplicando la técnica de Young y Ziveri (2000) a partir del recuento visual de especies, haciendo especial hincapié en las ventajas de la técnica propuesta frente a la de Young y Ziveri (2000).
- Analizar e interpretar desde un punto de vista ecológico y oceanográfico los datos obtenidos de flujo de carbonato debido a cocolitos en la zona del Frente Polar del océano Austral.

Área de estudio

En 2002 la Organización Hidrográfica Internacional definió el océano Antártico como la zona que se extiende desde la costa antártica hasta los 60° Sur. Su uniformidad y su coherencia hacen que tenga entidad propia, a partir de la cual se extienden hacia el norte los océanos Pacífico, Índico y Atlántico. Oceanográficamente la dinámica e influencia del océano Antártico se extiende más al Norte que los 60° señalados por la Organización Hidrográfica, pudiéndose distinguir en él varias zonas con características diferenciadas.

Mientras que en las zonas de afloramiento (upwelling) el agua profunda aporta gran cantidad de nutrientes, a lo largo de la costa del continente antártico, especialmente en el mar de Wedell y, en menor medida, en el mar de Ross y la bahía de Prydz se produce el hundimiento de grandes masas de agua que condicionan la circulación profunda. Debido a su baja densidad, consecuencia de las bajas temperaturas y salinidad, el agua profunda formada en el antártico (AABW) fluye por el fondo hacia el resto de los océanos, siendo de gran importancia en la circulación termohalina global (figura 5.1). Este agua profunda interacciona con masas de agua superiores a medida que se desplaza hacia el norte, formando las corrientes de agua profunda circumpolar (CDW).

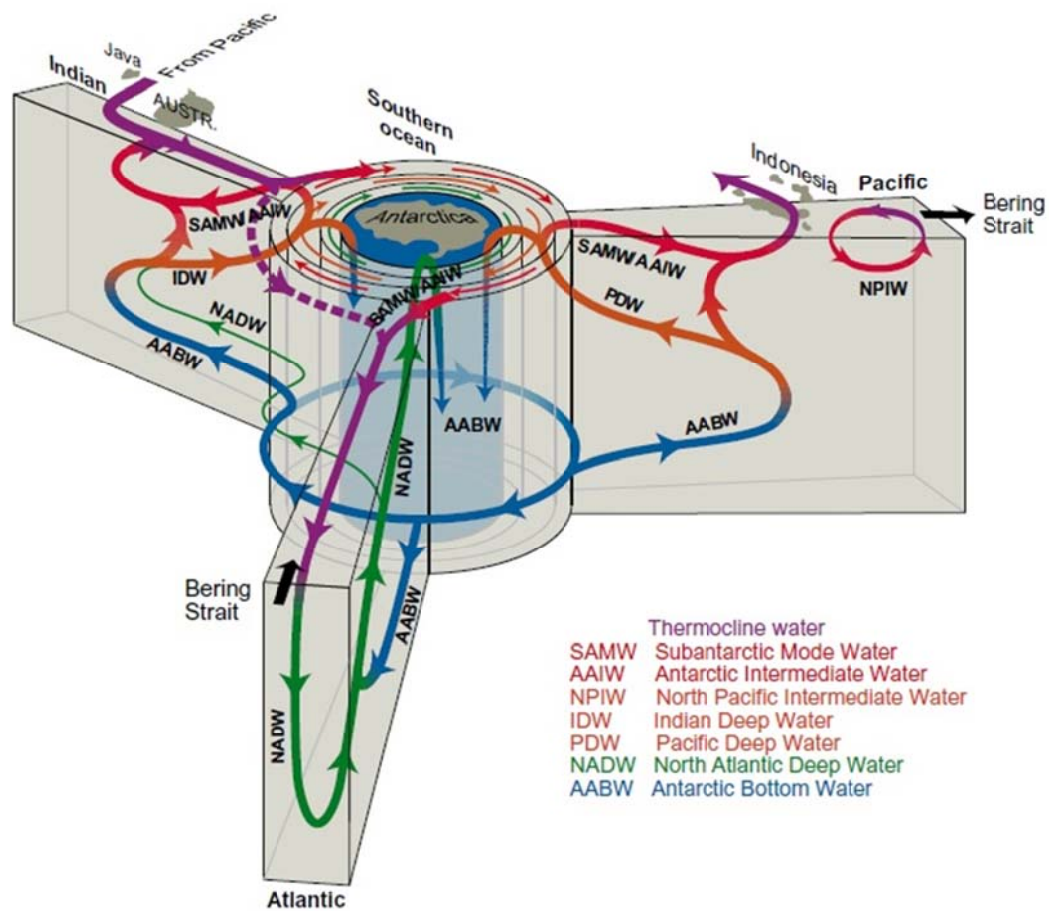


Fig. 5.1 Influencia de las aguas profundas formadas en el océano Antártico en la circulación termohalina global. Figura tomada de Siedler et al., 2013.

La dinámica superficial del océano Austral está controlada por dos grandes corrientes: la Corriente Circumpolar Antártica y la Corriente Costera. Mientras que la Corriente Costera gira en una dirección E-O, contraria a las agujas del reloj, en concordancia con el anticiclón atmosférico, la Corriente Circumpolar Antártica lo hace en sentido horario O-E. Entre ambas se sitúa una zona de convergencia.

La Corriente Circumpolar Antártica se divide en tres zonas, con diferentes temperaturas y salinidades, separadas entre sí por los llamados frentes polares. De norte a Sur se disponen el Frente Subantártico (SAF por sus siglas en inglés) y el Frente Polar (PF). La zona entre ambos frentes se conoce como Zona del Frente Polar (PFZ) (figura 5.2).

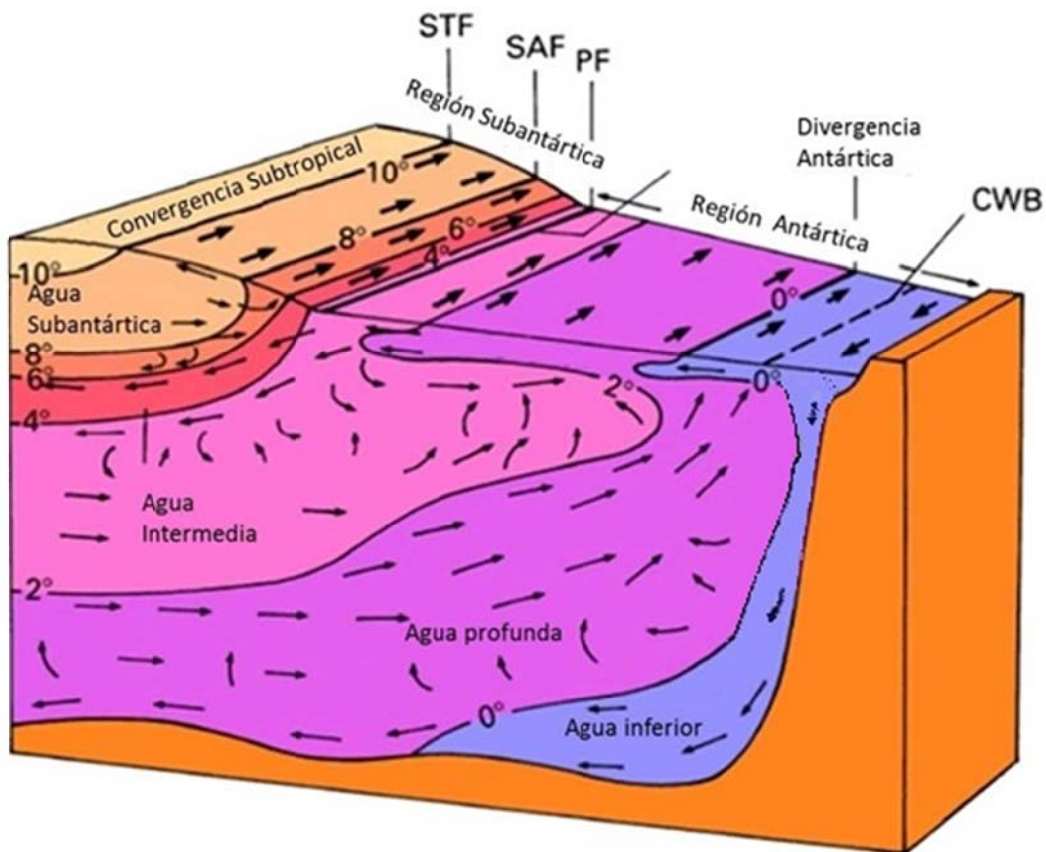


Fig. 5.2 Masas de agua y circulación en el océano Austral. Modificada de Tomzack, y Godfrey, 2003.

El océano Austral contiene aproximadamente el 40% del CO₂ antropogénico presente en los océanos y el incremento de CO₂ disuelto está originando una disminución en su PH. Tiene grandes gradientes superficiales de carbonato, producción primaria, temperatura, salinidad y nutrientes. Por una parte, aguas profundas ricas en nutrientes y dióxido de carbono afloran a la superficie (Caldeira y Duffy, 2000), principalmente al sur de la zona del Frente Polar. Pero a causa de factores como el bajo ángulo de incidencia de la radiación solar o la falta de hierro, a pesar haber nutrientes en abundancia el fitoplancton no es tan abundante como podría ser, salvo en regiones como las zonas de los frentes polares, los sistemas costeros o en los alrededores de algunas islas, donde el hierro fertiliza la capa superficial originando eclosiones de fitoplancton en primavera y en verano. Las altas latitudes hacen que la radiación solar sea un factor de gran importancia en la dinámica de la zona, pues durante el invierno austral la escasez de radiación solar provoca una disminución de las temperaturas, y minimiza la fotosíntesis, actuando como factor limitante en el desarrollo de fitoplancton. Esto hace que, a pesar de la abundancia de nutrientes, la “bomba biológica” no esté operando a su máxima

capacidad (De La Rocha, 2010) originando poca abundancia de fitoplancton en algunas zonas (Trull et al., 2001). El océano Antártico es la región más extensa de todos los océanos donde se dan condiciones de altos nutrientes pero escasos niveles de clorofila, con una productividad primaria altamente variable a lo largo de la Corriente Circumpolar Antártica, donde las eclosiones de fitoplancton se han observado únicamente en regiones asociadas con los frentes polares, y en donde la zona del Frente Polar está asociada a elevados niveles de productividad primaria (Gravalosa et al., 2008).

El papel de la región en el cambio climático depende del balance entre la absorción y la emisión de dióxido de carbono (Anderson et al., 2002), por lo que conocer el papel que desempeñan los cocolitóforos en la zona es de gran importancia. El estudio del flujo de carbonato debido a cocolitos que acaba formando parte de los sedimentos permitirá conocer hasta qué punto la región actúa como sumidero de carbonato.

Dentro del proyecto SAZ (Trull et al., 2001), continuado posteriormente dentro del Australian Integrated Marine Observing System Southern Ocean Time Series (Trull et al., 2010), varias trampas de sedimentos fueron situadas en las distintas regiones polares entre Australia y la Antártida, a una longitud de 140° E y a latitudes de 47°, 51°, 54° y 61° S.

En el presente trabajo se han analizado 146 muestras procedentes de la trampa situada a 54° S, en la zona del Frente Polar, a profundidades de 800 m y 1500 m, siendo la altura de la columna de agua de 2280 m (figura 5.3). Se trata de una zona donde las temperaturas del agua superficial varían entre los 5 y 6 grados Celsius en verano y los 3 en invierno. En la zona del Frente Polar el agua es subducida hacia el norte, por debajo de las zonas de giro subtropical, estando la producción primaria limitada por los aportes de hierro y por la luz (Boyd et al., 2001).

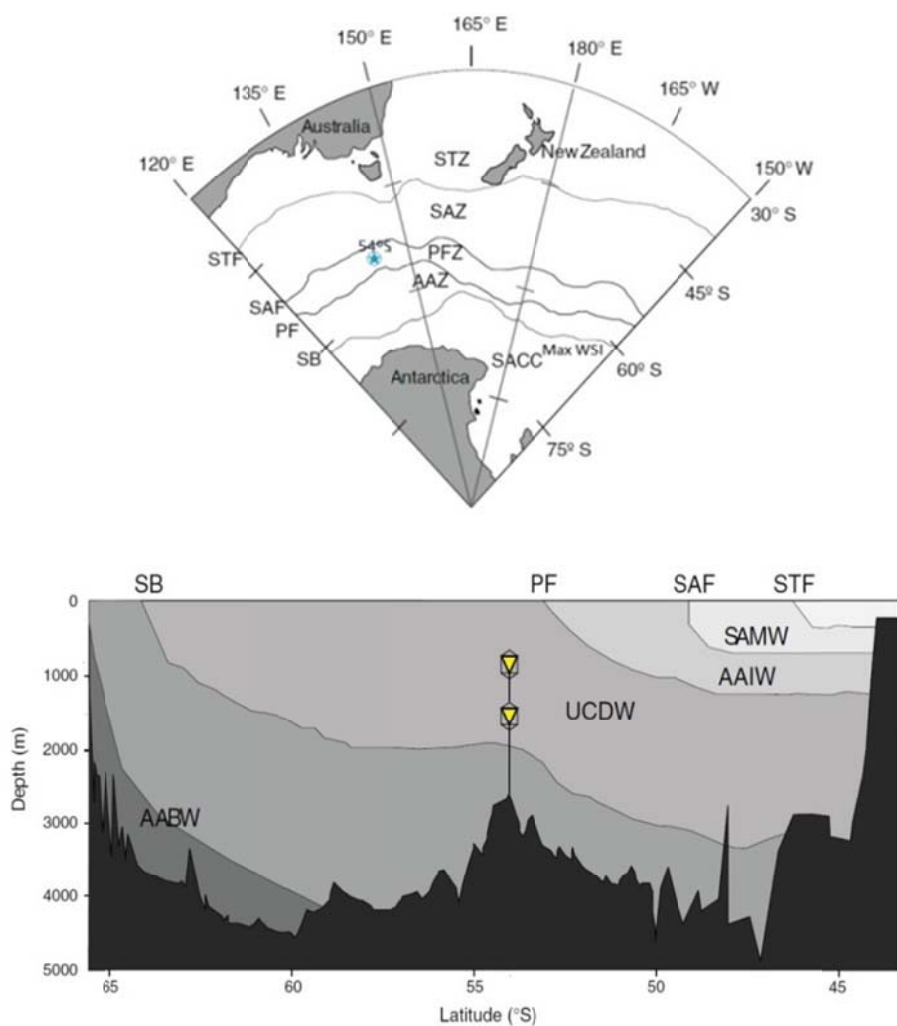


Fig. 5.3 **Superior:** localización de la trampa de sedimentos en relación con las distintas zonas polares: (STF - Subtropical Front, SAF - Subantarctic Front, PF – Polar Front, SB - Southern Boundary), regiones (STZ – Subtropical Zone, SAZ – Subantarctic Zone, PFZ – Polar Front Zone, ACC – Antarctic Zone y SACCZ - Zona sur del ACC) y extensión máxima del hielo en invierno (MaxWSI). **Inferior:** Batimetría, situación de las trampas y principales masas de agua SAMW – Subantarctic Mode Water, AAIW – Antarctic Intermediate Water, UCDW – Upper Circumpolar DeepWater, LCDW– Lower Circumpolar Deep Water and AABW – Antarctic Bottom Water. Figura adaptada de Rigual-Hernández et al. (2015).

Material y Metodología

El site 140° E 54° S estaba equipado con dos trampas de sedimentos McLane Parflux situadas a profundidades de 800 y 1500 m, de forma cónica y con un área de captura de 0,5 m². El sistema de rotación automático se estableció con intervalos basados en los flujos esperados, de entre 8,5 días para el verano y 45 días para el invierno.

Las botellas de muestreo, con una capacidad de 250 ml, fueron tapadas a bordo con una solución de tetraborato de sodio (1 g/l), cloruro de sodio (5 g/l), cloruro de estroncio (0,22 g/l) y cloruro de mercurio (3g/l) y posteriormente almacenadas a oscuras a 4 °C. Tras filtrarlas únicamente la fracción menor de 1mm ha sido analizada, separada en 10 partes iguales utilizando un separador McLane WSD-10. Los análisis geoquímicos han sido realizados en la Universidad de Tasmania, donde, entre otros parámetros, el contenido total de carbonato ha sido medido mediante análisis químico por acidificación con ácido fosfórico en un sistema cerrado (Trull et al., 2001). Estos datos han sido facilitados por Andrés Rigual, de la Universidad Macquarie en Australia y han sido recientemente publicados en Rigual et al., 2015.

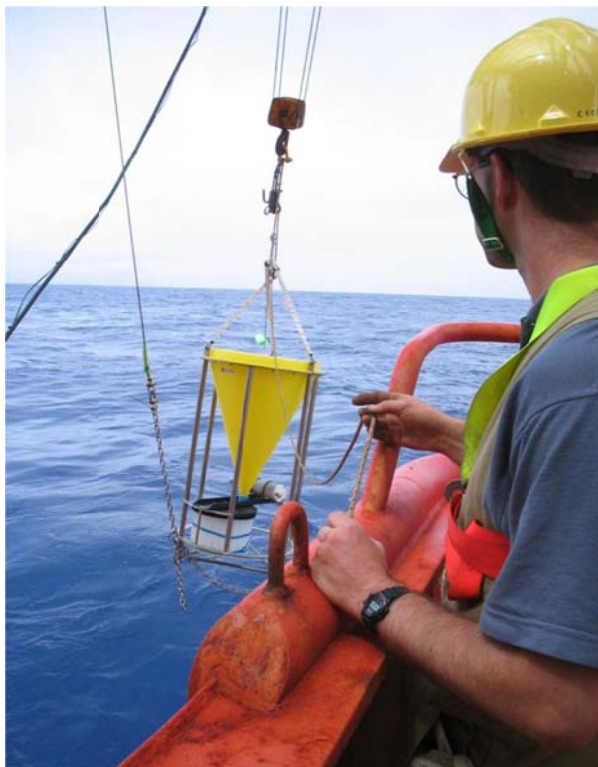


Fig. 5.4 Trampa de sedimentos McLane Parflux similar a la utilizada. Fotografía cortesía de Andrés Rigual.

Alicuotas de las muestras originales fueron llevadas a la Universidad de Salamanca y preparadas para su observación microscópica mediante una técnica de decantación con la que se obtuviera una distribución homogénea que permitiera el cálculo de flujos totales. La técnica utilizada ha sido la de Flores y Sierro (1997), ligeramente modificada al partir de muestras líquidas (figura 5.5).

La técnica original (Flores y Sierro, 1997) fue desarrollada para sedimento sólido, por lo que su primera parte consiste en pesar una determinada cantidad de sedimento seco, mezclarlo en un vial con una cantidad conocida de agua destilada y tamponada para evitar así la disolución del carbonato, disgregando y homogeneizando el contenido del vial con ultrasonidos para tener una distribución homogénea de la que se toma una determinada cantidad con una micropipeta. En el presente estudio, al partir de muestras líquidas, no fue necesario realizar esta primera parte para conseguir la disgregación del sedimento en un vial, sino que directamente se utilizaron los viales originales. Siguiendo ya la técnica de Flores y

Sierro (1997), 300 microlitros fueron tomados de cada muestra con una pipeta y decantados manualmente en una placa Petri de área conocida en cuyo fondo se había colocado un cubreobjetos y en la que se había vertido previamente agua destilada tamponada y gelatina neutra, para evitar que la tensión superficial del agua concentrara más partículas en los bordes de la placa.

Tras dejar reposar durante un mínimo de 12 horas, para que las partículas sedimentaran en el fondo, el líquido sobrante se extrajo de cada muestra con una pequeña tira de papel secante, que absorbe lentamente sin causar turbulencias que alteren la distribución homogénea del material sedimentado en el fondo de la placa Petri. Tras dejarlo en reposo a temperatura ambiente hasta que se seca por completo, se extrajo el cubreobjetos que se había puesto en el fondo de la placa de Petri y se colocó sobre una placa calentada a 90° C. Utilizando una gota de bálsamo de Canadá diluido al 50 % con xileno se montó el portaobjetos, previamente calentado, sobre el cubreobjetos. La muestra, ya montada, se mantuvo en una estufa a 40° C durante varias horas hasta que el bálsamo se endureció completamente (figura 5.5).

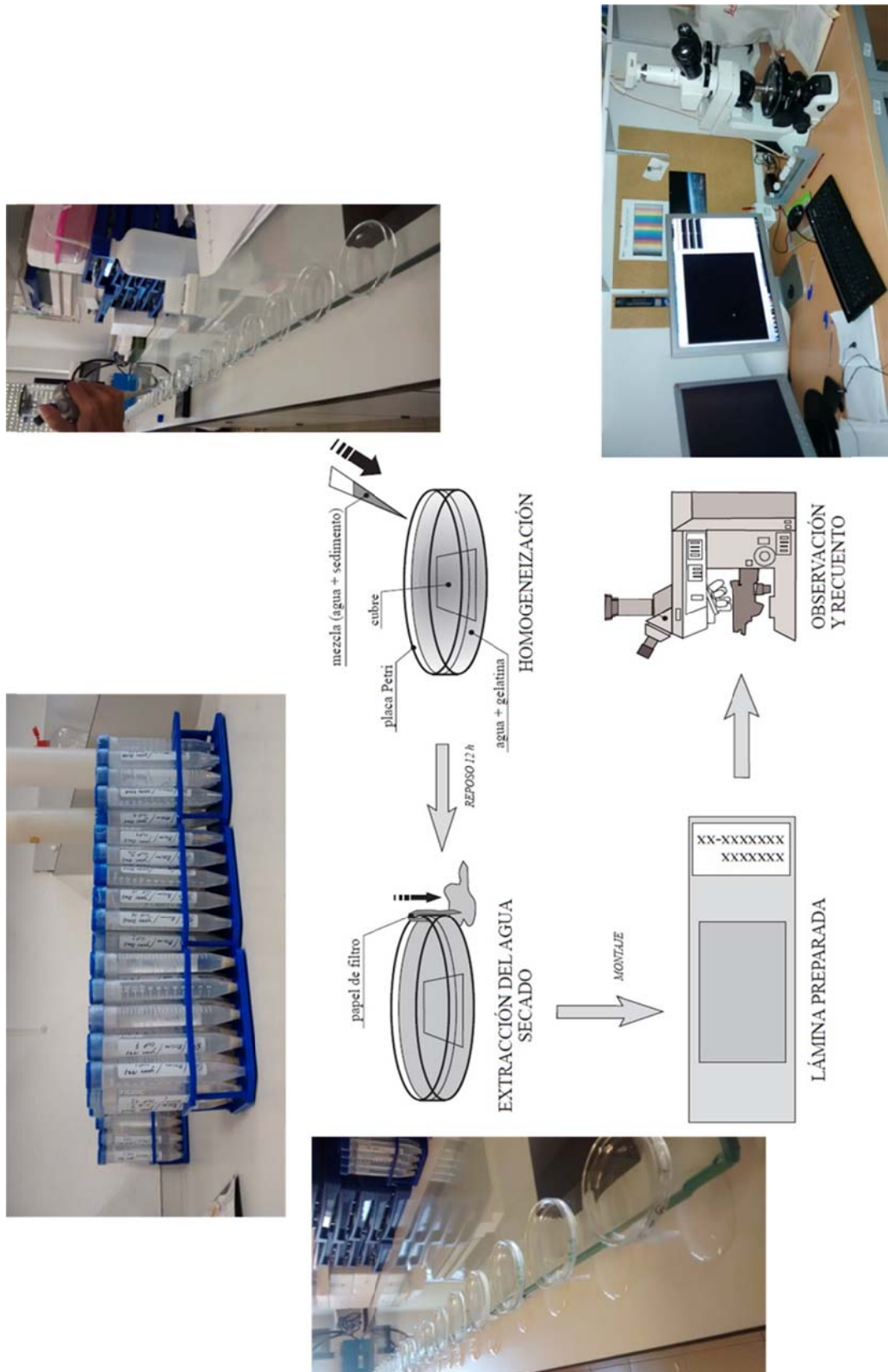


Fig. 5.5 Proceso de preparación de las muestras. Modificado de Flores y Siervo (1997).

Solamente algunas de las muestras estaban disponibles para su análisis (tabla 5.1):

Año	Día y mes	Disponible	
		800 m	1500 m
1997			
	26/9	X	X
	13/10		X
	30/10		X
	7/11		X
	16/11	X	X
	24/11	X	X
	3/12		X
	11/12		X
	20/12	X	X
	28/12	X	X
1998			
	4/1		X
	8/1		X
	12/1		X
	16/1		X
	21/1	X	X
	25/1	X	X
	31/1	X	X
	9/2	X	X
	17/2		X

Año	Día y mes	Disponible	
		800 m	1500 m
2003			
	2/1	X	
	12/1	X	
	22/1	X	
	1/2	X	
	11/2	X	
	21/2	X	
	3/3	X	
	13/3	X	
	23/3	X	
	2/4	X	
	12/4	X	
	22/4	X	
	9/5	X	
	11/6	X	
	23/7	X	
	25/8	X	
	4/10	X	X
	18/10	X	X
	1/11	X	X
	15/11	X	X

Año	Día y mes	Disponible	
		800 m	1500 m
2005			
	20/12		X
	22/12	X	
	28/6	X	X
	1/1		X
	8/1	X	
	13/1		X
	25/1		X
	25/1	X	
	11/2	X	
	28/2	X	
	17/3	X	
	3/4	X	
	20/4	X	
	7/5	X	
	7/6	X	
	22/7	X	
	5/9	X	
	8/9		X
	18/10	X	X
	3/11	X	X

Año	Día y mes	Disponible	
		800 m	1500 m
2001			
	23/11		X
	1/12		X
	9/12		X
	17/12		X
	25/12		X
2002			
	2/1		X
	10/1		X
	23/11	X	
	13/12	X	
	23/12	X	

Año	Día y mes	Disponible	
		800 m	1500 m
	29/11	X	X
	13/12	X	X
	27/12	X	X
2004			
	10/1	X	X
	24/1	X	X
	7/2	X	X
	21/2	X	X
	6/3	X	X
	20/3	X	X
	3/4	X	X
	17/4	X	
	1/5	X	
	25/5	X	
	29/6	X	X
	3/8	X	X
	7/9	X	
	2/10	X	

Año	Día y mes	Disponible	
		800 m	1500 m
	19/11	X	X
	5/12	X	X
	21/12	X	X
2007			
	6/1	X	X
	22/1	X	X
	7/2	X	X
	23/2	X	X
	11/3	X	X
	27/3	X	X
	12/4	X	X
	28/4	X	X
	14/5	X	X
	30/5	X	X
	18/6	X	X
	11/7	X	X
	3/8	X	
	23/8	X	
	8/9	X	
	24/9	X	

Tabla 5.1 Muestras disponibles.

La contribución de los cocolitos al flujo de carbonato fue estimada a partir de la cantidad de calcita presente en una serie de imágenes fotográficas, medida a partir de la relación entre el nivel de gris de cada pixel y el espesor de la calcita.

Para ello, entre 25 y 30 imágenes de cada muestra fueron tomadas con el programa de captura Nis-Elements (4059 imágenes en total). Las imágenes fueron procesadas con el programa C-Calcita, y para su calibración se empleó una espícula calcárea. Los grandes fragmentos de calcita no pertenecientes a cocolitos fueron seleccionados y eliminados de cada imagen antes de su medición.

El programa C-Calcita permite calcular la cantidad de carbonato total presente en una imagen determinada y la calibración vertical y horizontal permite conocer qué área es la que aparece en cada fotografía. En el presente trabajo se ha utilizado un microscopio Nikon Eclipse LV100 POL equipado con dos láminas $\lambda/4$ con el fin de obtener polarización circular, un objetivo 100× H/N2 y una cámara digital Nikon DS-Fi1. Con esta configuración, el lado de cada pixel tiene una longitud equivalente a 0,035 μm . Al tener cada fotografía un tamaño de 1920x2560 píxeles, el área capturada en cada imagen es de $6,02112 \cdot 10^{-9} \text{ m}^2$.

La masa contenida en cada imagen es una fracción de la que se ha decantado de forma homogénea en la placa de Petri, cuya área es también conocida. A su vez, el volumen contenido en la pipeta no es más que una fracción del volumen contenido en el vial, que a su vez es una fracción del material sedimentado en la trampa original, de área conocida y que ha permanecido abierta un número de días también conocido. Todo ello hace que el flujo diario de carbonato (calcita) debido a cocolitos se pueda calcular como:

$$\text{Flujo de Calcita debido a Cocolitos} = \frac{\sum C_{mi}}{N} \cdot \frac{A_p}{A_i} \cdot \frac{V_{tot}}{V_p} \cdot \frac{1}{A_t} \cdot \frac{1}{N_d}$$

Donde:

C_{mi} es la calcita debida a cocolitos medida en cada imagen

N es el número de imágenes tomadas de cada muestra

A_p Es el área del disco de Petri en el que las muestras fueron decantadas

A_i es el área de cada imagen

V_{tot} es el volumen total de muestra inicial

V_p es el volumen de la alicuota decantada en el disco de Petri.

A_t es el área de la trampa

N_d es el número de días que la trampa ha permanecido abierta.

Resultados

Flujo de carbonato debido a cocolitos. Comparación con el carbonato total

El flujo de carbonato debido a cocolitos calculado a partir de las imágenes y la conversión del nivel de gris en espesor, comparado con el contenido total de carbonato analizado en el laboratorio se muestran en la figura 5.6.

Existe una gran similitud entre ambos resultados, que matemáticamente se pone también de manifiesto, pues el coeficiente de correlación entre ambas curvas es de 0,71.

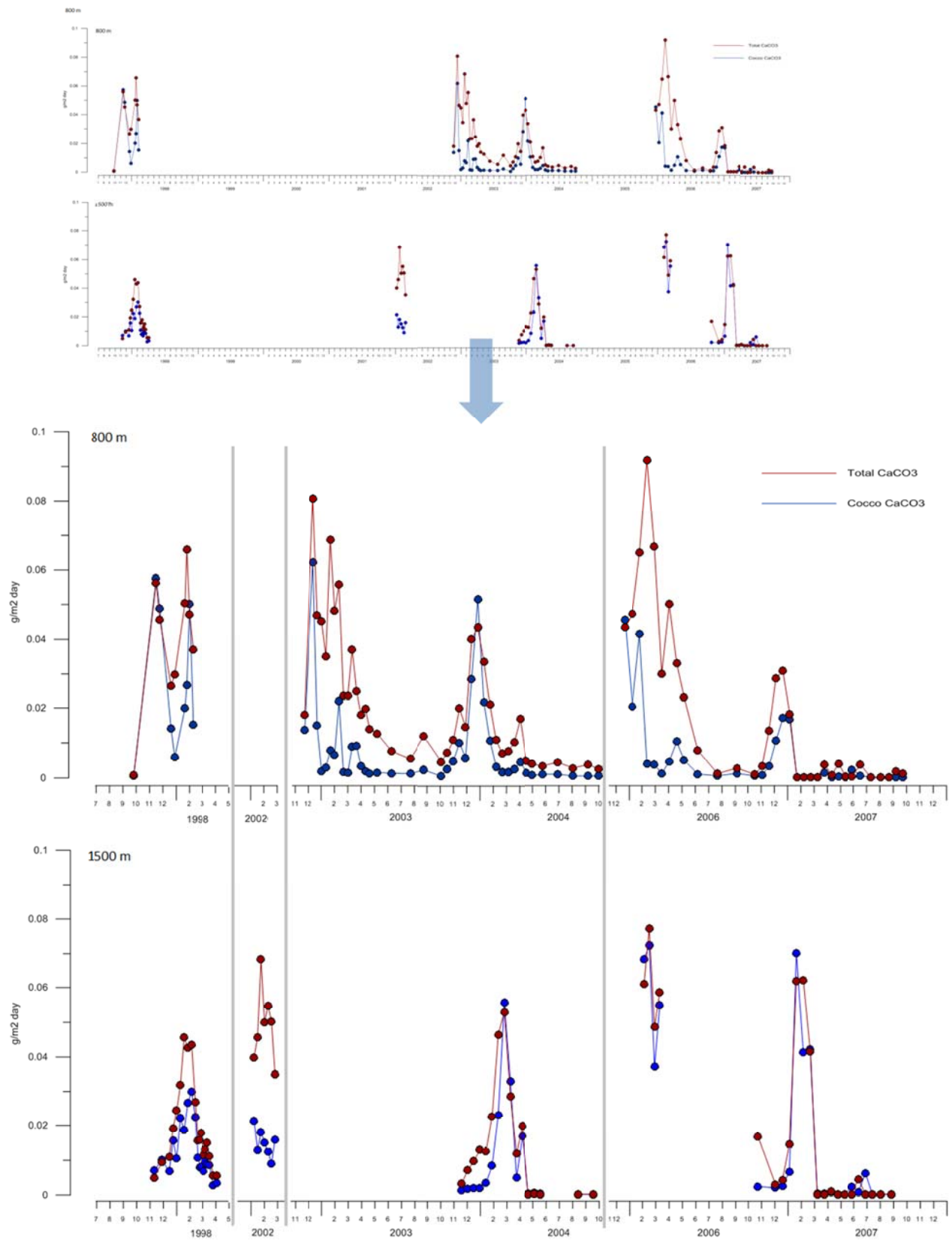


Fig. 5.6 Flujo de carbonato debido a cocolitos (azul) comparado con el contenido total de carbonato analizado en el laboratorio (rojo) para todas las muestras.

Flujo de carbonato debido a cocolitos. Comparación con la técnica de Young y Ziveri (2000)

Asociaciones y flujos de cocolitos

Fue necesario examinar las muestras visualmente con el microscopio polarizador con el fin de comparar los resultados de flujo de carbonato debido a cocolitos medidos utilizando el análisis de las imágenes fotográficas con los valores que se podrían estimar contando visualmente el número cocolitos de cada especie presente en uno o varios campos visuales, calculando a partir de ello los flujos de cocolitos de cada especie y multiplicándolos por la masa media de cada especie de cocolito estimada por Young y Ziveri (2000), siguiendo estudios como el de Broerse et al.(2000).

Para ello, en primer lugar se han de determinar las asociaciones y concentraciones de cocolitos por campo visual. La sistemática ha sido la establecida a partir de la clasificación propuesta por Young y Bown (1997), posteriormente revisada por Young y otros. (2003).

La observación microscópica de las muestras revela que la asociación de cocolitóforos está fuertemente dominada por la especie *Emiliana huxleyi*, con abundancias relativas del más del 98% en la mayoría de las muestras. Otras especies, como *Gephyrocapsa oceanica*, *Calcidiscus leptoporus*, *Gephyrocapsa*. < 3 μ m, *Gephyrocapsa* cf. *muelleriae*, *Coccolithus pelagicus*, *Umbilicosphaera* spp., *Neosphaera coccolithomorpha*, *Oolithothus* spp., *Syracosphaera* spp., *Helicosphaera carteri* y *Pontosphaera* spp., también están presentes, pero en cantidades mucho menores (figuras 5.7).

Emiliania huxleyi (Lohmann, 1902, Hay y Mohler, 1967) es la especie más abundante y de más amplia distribución en los océanos actuales (Winter et al., 1994). Se trata de una especie cosmopolita, que ha sido observada en un amplio rango de condiciones de temperatura y salinidad (Okada y Honjo, 1973), desde aguas polares a tropicales. Altos flujos de *E. huxleyi* han sido documentados en ambientes ricos en nutrientes, a lo largo de los bordes de las zonas de giro subtropical en zonas de upwelling y a lo largo de los bordes de las plataformas continentales (Mergullao et al., 2013).

Tiene diferentes morfotipos, con variaciones en su tamaño, forma y grado de calcificación (Young et al., 2013). Estos morfotipos están relacionados con variaciones en su genotipo y, aunque con un microscopio óptico no es posible diferenciar todos los detalles de cada uno de ellos, sí es posible discernir entre los cocolitos mayores de 4 μm y los menores. En las muestras analizadas los cocolitos de *E. huxleyi* con un tamaño menor de 4 μm son los más abundantes, y los mayores de 4 μm , que han sido usados como indicadores aguas frías en el Atlántico (Flores et al., 2010), aparecen también en mayores cantidades que el resto de especies.

Especies habituales en latitudes bajas, como *Gephyrocapsa oceánica* (Kamptner, 1943) también aparecen esporádicamente, aunque siempre en concentraciones mucho menores que *E. huxleyi*. *G. oceánica* es una especie comúnmente encontrada en aguas tropicales y subtropicales (Okada y McIntyre, 1979), asociada también con aguas ricas en nutrientes, como los márgenes continentales o las zonas de upwelling (Okada y Honjo, 1975, Mergullao et al., 2013).

Calcidiscus leptoporus (Murray y Blackman, 1898. Loeblich y Tappan, 1978) está también representada en bajas concentraciones, con un pico en noviembre de 2003. Se trata de una especie de la zona fótica superior, encontrada en una gran variedad de zonas, desde polares a tropicales. Tiene tres morfotipos de diferentes tamaños (Knappertsbush et al., 1997), que otros autores consideran subespecies (Geisen et al., 2002) o incluso especies distintas (Quinn et al., 2004; Young et al., 2003). Es considerada una especie característica de condiciones oligotróficas y su forma de tamaño intermedio ha sido relacionada con aguas frías y pobres en nutrientes (Giraudeau y Rogers, 1994).

Una vez conocido el número de cocolitos de cada especie presente en cada campo visual, el flujo diario de cocolitos de cada especie se puede calcular como:

$$\text{Fujo} = \frac{\sum Cfi}{N} \cdot \frac{Atot}{Am} \cdot \frac{Vtot}{Va} \cdot \frac{1}{St} \cdot \frac{1}{Nd}$$

Donde:

Cf es el número de cocolitos presente en cada campo visual, *i*

N es el número de campos visuales analizados

Atot es el área total del disco de Petri en el que las muestras han sido decantadas.

Am es el campo visual del microscopio

Vtot es el volumen total de la muestra recogida en la trampa

Va es el volumen de la alícuota tomada para preparar cada muestra por decantación

St es el área de la trampa de sedimentos

Nd es el número de días que ha permanecido abierta la botella en la trampa

Los resultados obtenidos para los flujos diarios de cocolitos por m² para cada una de las profundidades de la trampa se muestran en las figuras 5.7.a y 5.7.b.

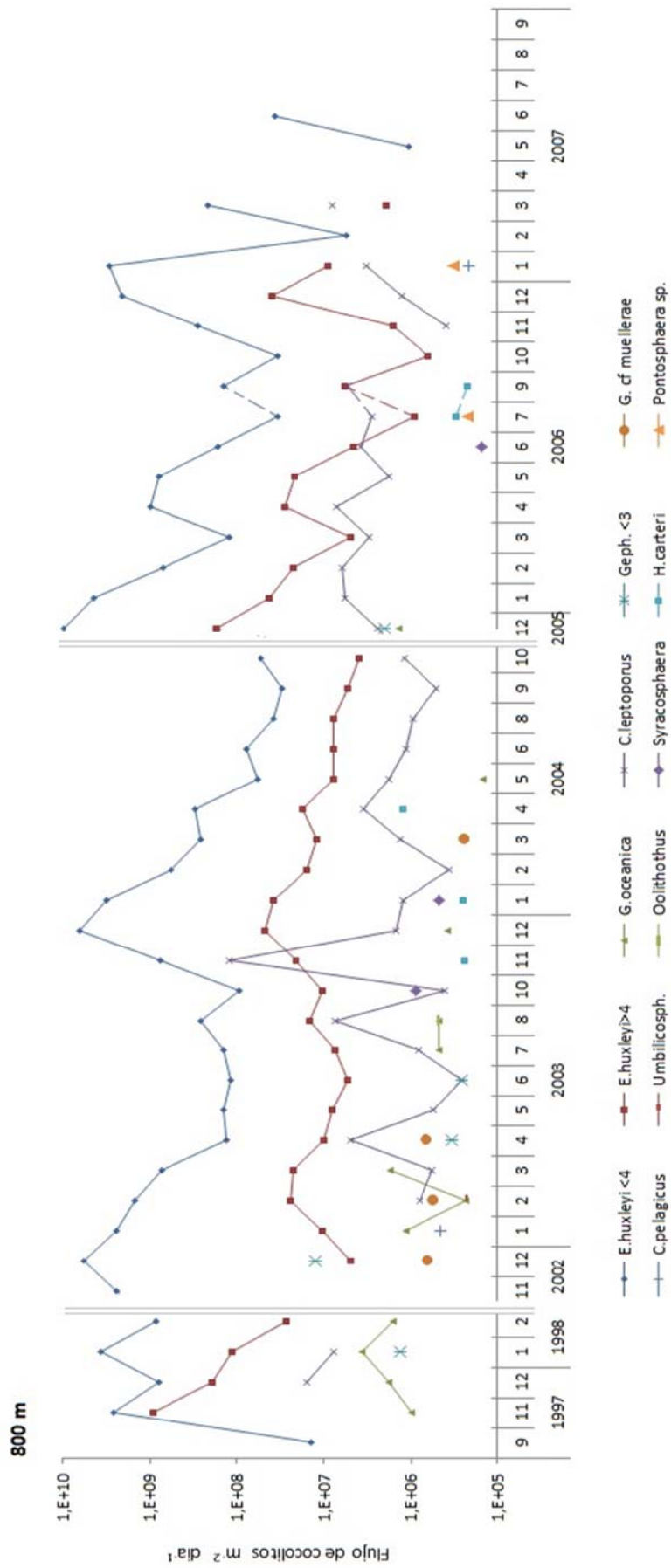


Fig. 5.7.a Asociaciones de cocolitofóridos y flujo de cocolitos a 800 metros de profundidad. Nótese la escala logarítmica.

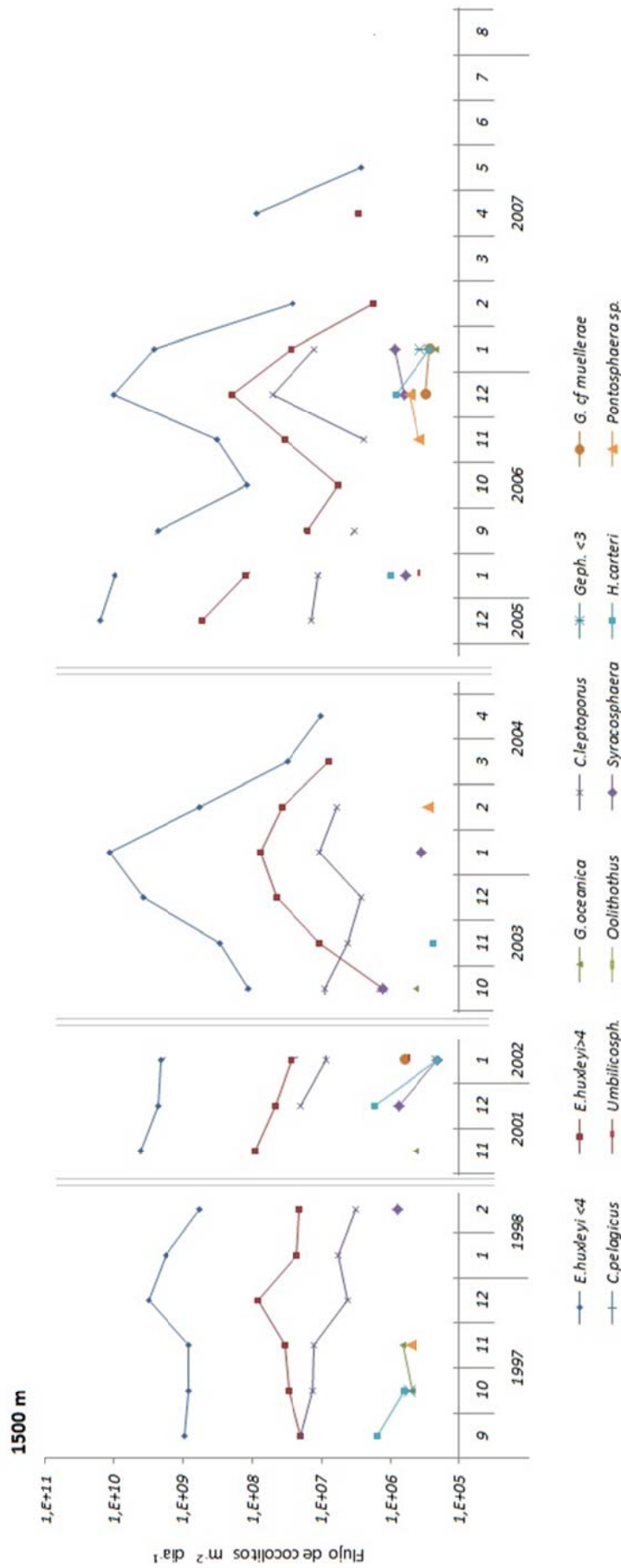


Fig. 5.7.b Asociaciones de coccolitofóridos y flujo de cocolitos a 1500 metros de profundidad. Nótese la escala logarítmica.

Flujo de carbonato

Una vez calculado el flujo diario de cocolitos de cada especie, la masa correspondiente se puede calcular multiplicando cada flujo por la masa de un cocolito ideal de cada una de las especies. Los valores tomados para cada especie de cocolito son los recomendados en Young y Ziveri (2000), quienes estimaron la masa de cada tipo de cocolito a partir de un modelo geométrico. El flujo total de calcita debido a cocolitos calculado con esta técnica será la suma del flujo debido a cada una de las especies.

La comparación entre el flujo de carbonato debido a cocolitos para cada profundidad estimado a partir de imágenes y el estimado a partir de los recuentos visuales de cocolitos de cada especie, junto con el contenido total de carbonato medido químicamente, se muestra en las figuras 5.8:

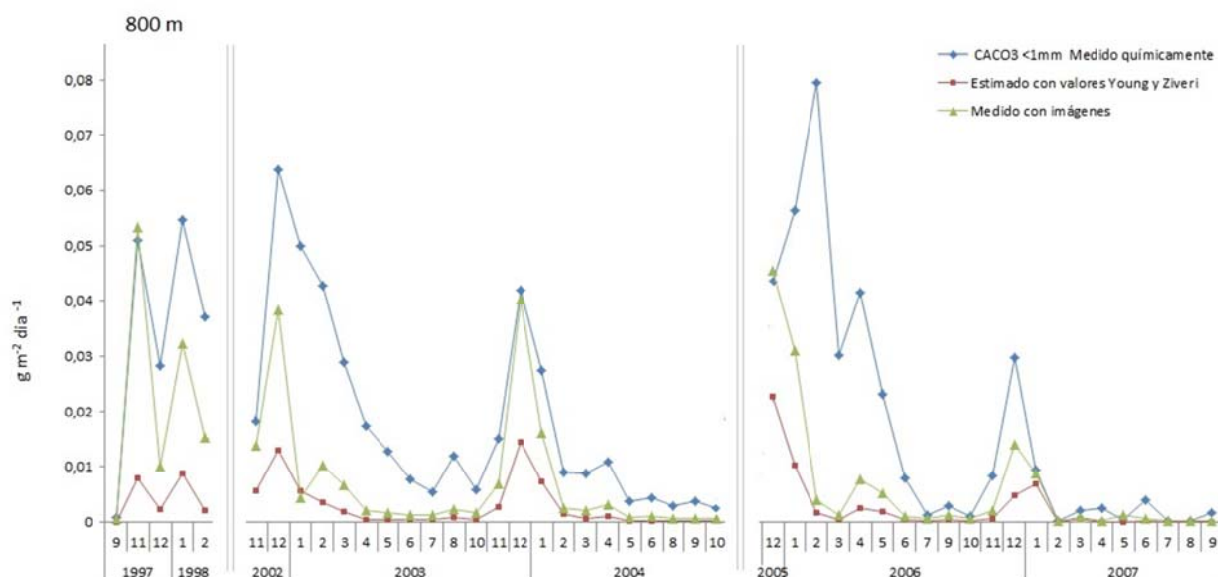


Fig. 5.8.a Comparación entre el contenido total de $CaCO_3$ y el carbonato debido a cocolitos estimado por dos metodologías diferentes para la trampa de 800 m. Se muestra también el contenido total de carbonato.

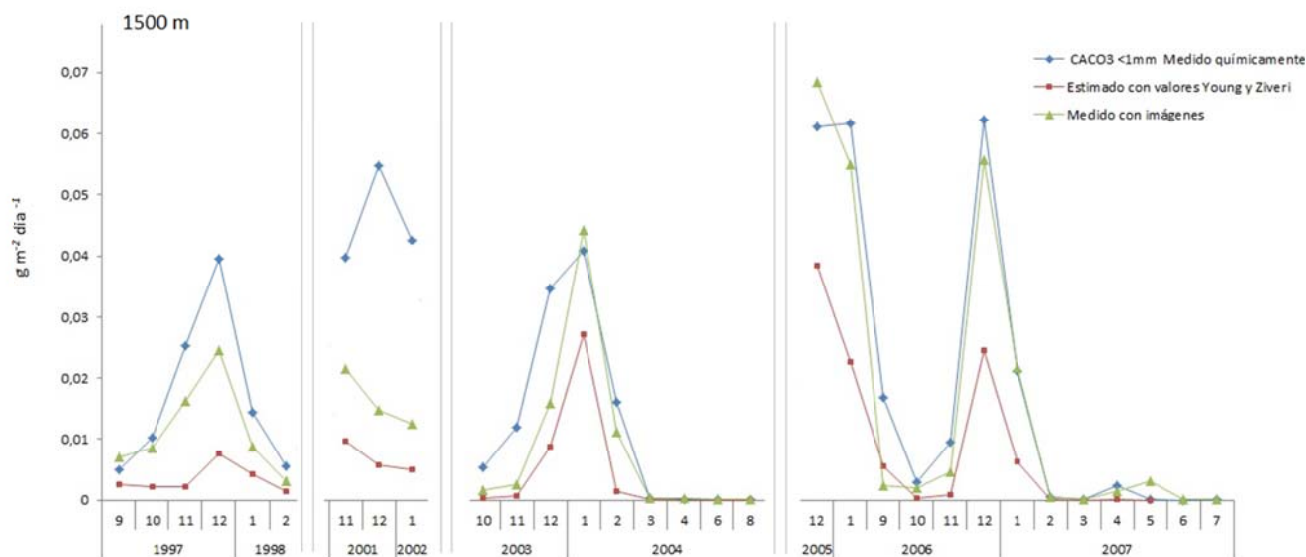


Fig. 5.8.b Comparación entre el contenido total de CaCO_3 y el carbonato debido a cocolitos estimado por dos metodologías diferentes para la trampa de 1500 m. Se muestra también el contenido total de carbonato.

Discusión

Los resultados obtenidos para el flujo de calcita debida a cocolitos utilizando la metodología de análisis de imágenes son, como cabía esperar, menores que el carbonato total, salvo en cinco (de 146) casos en los que existe una pequeña diferencia que puede atribuirse a errores estadísticos en la nueva metodología o al error inherente en el proceso de laboratorio al medir químicamente el contenido de carbonato. Sin embargo, la interpretación que se debe dar a esos valores, que es la de que el contenido en calcita se debe mayoritariamente a los cocolitos, es la misma a pesar de la falta de concordancia.

Si se comparan las estimaciones de flujo de carbonato debido a cocolitos con las obtenidas empleando la metodología de Broerse et al (2000) a partir de los valores de masa media de cada especie de cocolito propuestos en Young y Ziveri (2000), se observa cómo los valores obtenidos mediante esta metodología son inferiores a los calculados mediante el análisis de imagen, si bien las tendencias y los órdenes de magnitud son similares, lo que también refuerza la consistencia de los resultados de la nueva técnica, al tratarse de dos metodologías totalmente diferentes. El hecho de que los resultados obtenidos con los valores

de Young y Ziveri sean menores que los calculados mediante el análisis de imagen se podría explicar ya que la asociación de cocolitóforos está dominada por *Emiliana huxleyi*, que presenta un amplio rango de valores de masa dependiendo de su tamaño, morfotipo y grado de calcificación, factores estos que no pueden ser tenidos en cuenta por la técnica de Young y Ziveri, pero que sí lo son en la nueva técnica presentada. Para la comparativa se han tomado los valores de masa media propuestos por Young y Ziveri (2000), sin tener en cuenta el tamaño real de cada cocolito en particular, o su grado de calcificación. Además, la metodología de análisis de imagen es capaz de medir fragmentos de cocolitos, mientras que la de Young y Ziveri únicamente contabiliza aquellos cocolitos identificados según su especie.

Si se comparan ambas estimaciones de flujo de carbonato debido a cocolitos con el contenido en CaCO_3 total medido, los valores obtenidos a partir de las estimaciones de Young y Ziveri son mucho menores, y la observación microscópica muestra que no existen tantos fragmentos de calcita no debida a cocolitos como para justificarla, pareciendo más coherentes los resultados obtenidos con la técnica de análisis de imagen.

Por tanto, la metodología propuesta para medir el flujo de carbonato debido a cocolitos a partir de imágenes, obtiene unos resultados coherentes, tanto con el contenido total de carbonato como con los que se obtendrían con la técnica de Young y Ziveri, pero con las siguientes ventajas sobre esta última:

El análisis de imagen supone realizar medidas directas de la masa de cada cocolito, por lo que se tienen en cuenta variables de gran importancia como son las variaciones de tamaño entre los diversos cocolitos de una misma especie, o variaciones de espesor debido a cambios en la calcificación, mezcla de diferentes morfotipos o disolución.

Otra ventaja es que el análisis de imágenes permite tener en cuenta fragmentos de cocolitos. El método es automático, por lo que no depende de la pericia del observador a la hora de identificar la especie a la que pertenece cada cocolito o a la hora de realizar el conteo.

Teniendo todo esto en cuenta, la metodología desarrollada supone una forma coherente y consistente de calcular el flujo de carbonato debido a cocolitos, con ventajas respecto a técnicas como la desarrollada por Young y Ziveri.

Es una metodología no destructiva y con trazabilidad, en la que las imágenes utilizadas pueden ser almacenadas y recalculadas si fuera necesario. Rápida y económica. La tarea que más tiempo consume, una vez que las muestras han sido preparadas para su

observación microscópica, es enfocar, tomar las imágenes y cambiar la muestra de nuevo, y esa tarea se puede acelerar si se utiliza un microscopio automatizado.

El punto más crítico de todo el proceso es que las muestras sean preparadas de tal forma que se obtenga una distribución homogénea, para que las imágenes tomadas sean representativas de toda la muestra.

Análisis e interpretación ecológica y oceanográfica

Una vez discutida la validez de la metodología empleada, se pretende en el siguiente apartado analizar los valores obtenidos para el flujo de carbonato debido a cocolitos con la nueva metodología desde un punto de vista oceanográfico. Las difíciles condiciones de trabajo en las zonas polares hacen que los datos y mediciones directos sean relativamente escasos, lo que pone en valor la cantidad y calidad de las muestras disponibles, pese al hecho de que, como se aprecia en la figura 5.6 y en la tabla 5.1, existen numerosos vacíos, y no siempre que se disponen de datos para una profundidad se tienen para la otra. Por ello el análisis de los resultados se realizará, por una parte agrupando datos mensuales, para poder ver la estacionalidad, y por otra comparando aquellas series en las que se dispone de datos correspondientes a los mismos periodos de distintos años, o a las dos profundidades simultáneamente.

Variación estacional

Con el fin de ver la variación estacional de la contribución de los cocolitos al flujo total de carbonato se pueden calcular los valores medios de los datos agrupados por meses:

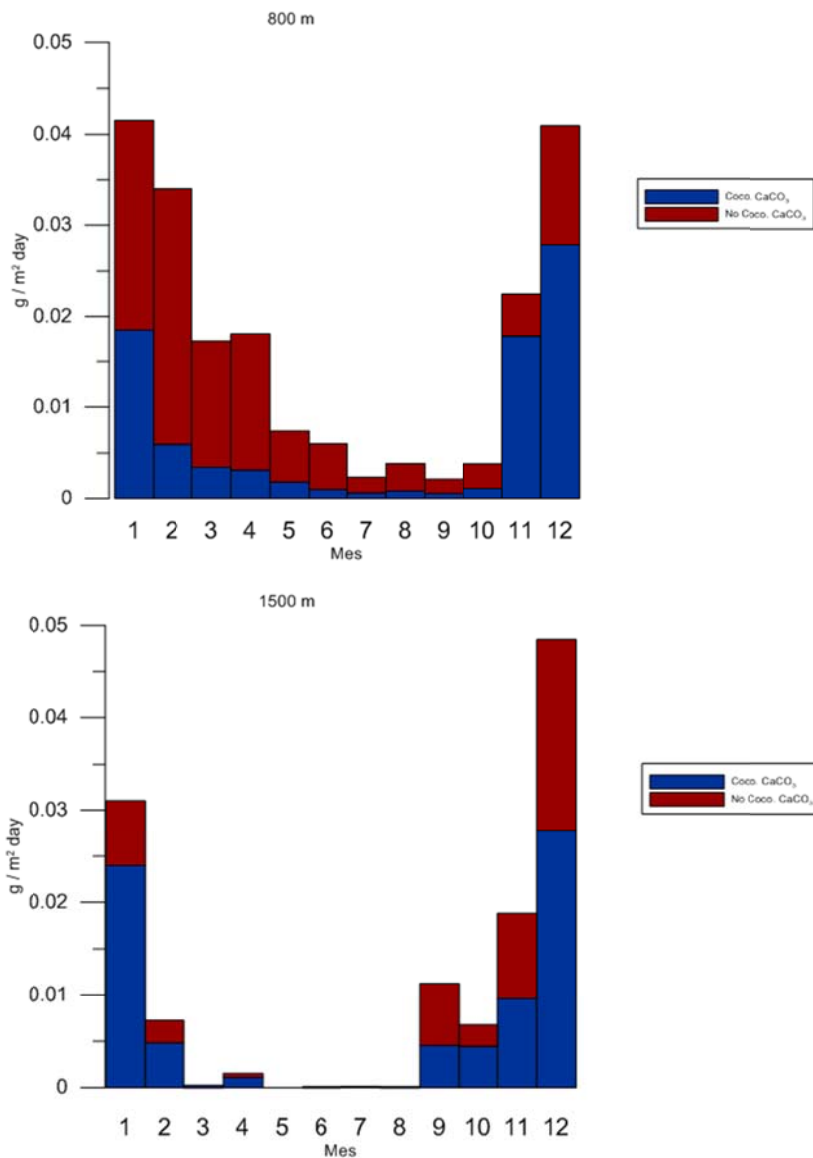


Fig. 5.9 Contribución mensual de los cocolitos al flujo total de carbonato.

Como se pone de manifiesto en la figura 5.9, se aprecia una fuerte estacionalidad, coincidiendo los flujos máximos con los meses correspondientes con el verano austral. En la trampa de 800 m, la proporción de calcita debida a cocolitos varía desde el 79% en noviembre hasta un mínimo del 17% en julio, mientras que en la de 1500 m el valor máximo es de un 77% en enero. En el periodo mayo-agosto ambos flujos fueron prácticamente cero, (el dato de mayo no ha sido representado, al obtener valores decarbonato debido a cocolitos mayores que el flujo total).

Los valores de flujo obtenidos son consistentes y coherentes con otros estudios realizados en trampas de sedimentos en la zona ártica del océano Pacífico (Timothy et al., 2013, Hwang et al., 2015).

Variación en profundidad

También es posible realizar una comparación del flujo debido a cocolitos en ambas profundidades, ya que existen dos periodos lo suficientemente largos como para poder hacerlo:

1. Desde el 4 de octubre de 2003 hasta el 3 de abril de 2004 (figura 5.10.a).
2. Desde el 18 de octubre de 2006 hasta el 11 de julio de 2007 (figura 5.10.b).

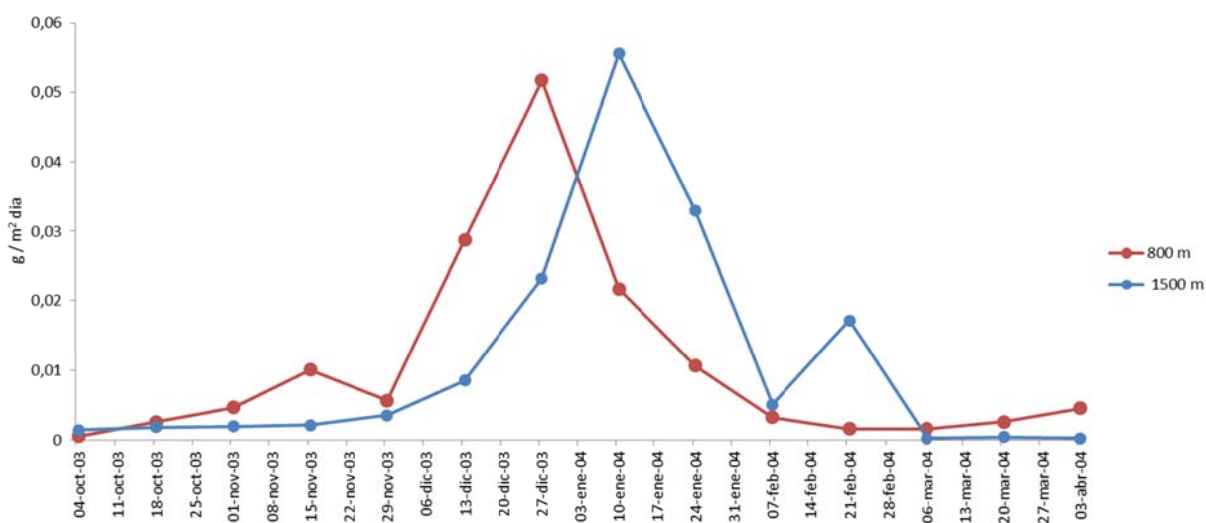


Fig. 5.10.a Flujo de carbonato debido a cocolitos medido a distintas profundidades a lo largo del periodo 4 de octubre de 2003 hasta el 3 de abril de 2004.

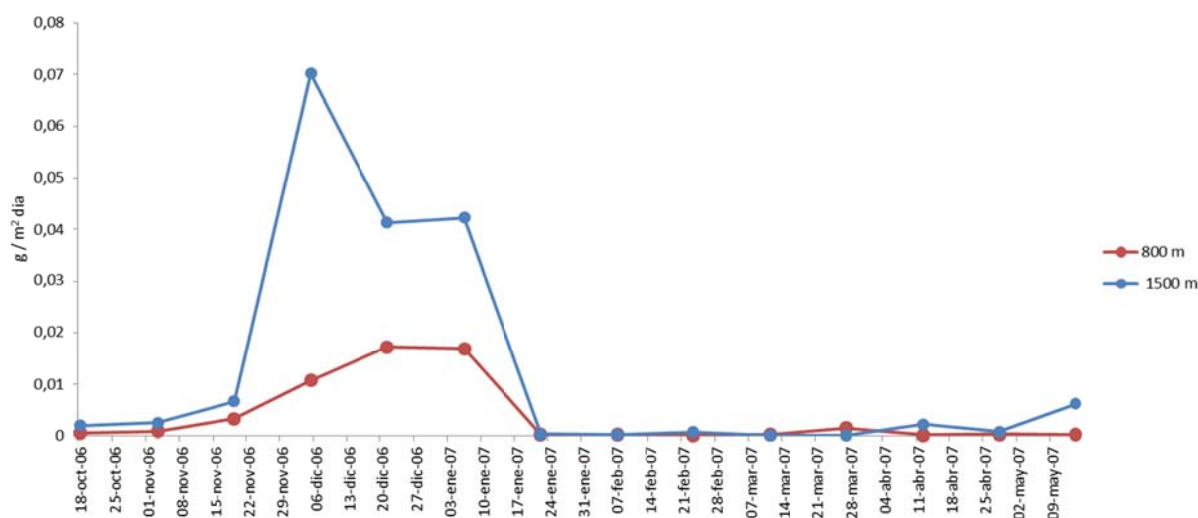


Fig. 5.10.b Flujo de carbonato debido a cocolitos medido a distintas profundidades a lo largo del periodo el 18 de octubre de 2006 hasta el 11 de julio de 2007.

En el primer periodo los flujos a ambas profundidades son similares, con un pequeño desfase que puede deberse al ritmo de hundimiento, que puede calcularse en unos 50 m al día. Esta tasa, junto con su grado de preservación y el grado de disgregación y fragmentación hace pensar que la mayoría de los cocolitos son transportados como agregados fecales, ya que la velocidad de hundimiento de los cocolitos individuales es mucho menor (Bach et al., 2012) y la preservación de los cocolitos es buena, hecho que depende de que sean transportados rápidamente de la zona de masas de agua corrosivas (Broerse et al. 2010).

En el periodo 2006-2007, el flujo a una profundidad de 1500 m es mayor que el de 800 m, llegando en algunos meses a triplicarlo. Los cambios de flujo con la profundidad pueden deberse a partículas que son transportadas horizontalmente entre regiones con distinta productividad (Thimothy et al., 2013).

Se puede realizar un análisis de las variaciones de flujo respecto a otros parámetros físicos y químicos, como la temperatura superficial (SST), el flujo de nitrato, la clorofila-a o con el índice de radiación fotosintéticamente activa (PAR por sus siglas en inglés), que es el tipo de radiación utilizada por los seres vivos para realizar la fotosíntesis y que se corresponde con una banda con longitudes de onda comprendidas entre 400 y 700 nanómetros, que es también la utilizada por los cocolitóforos (figura 5.11).

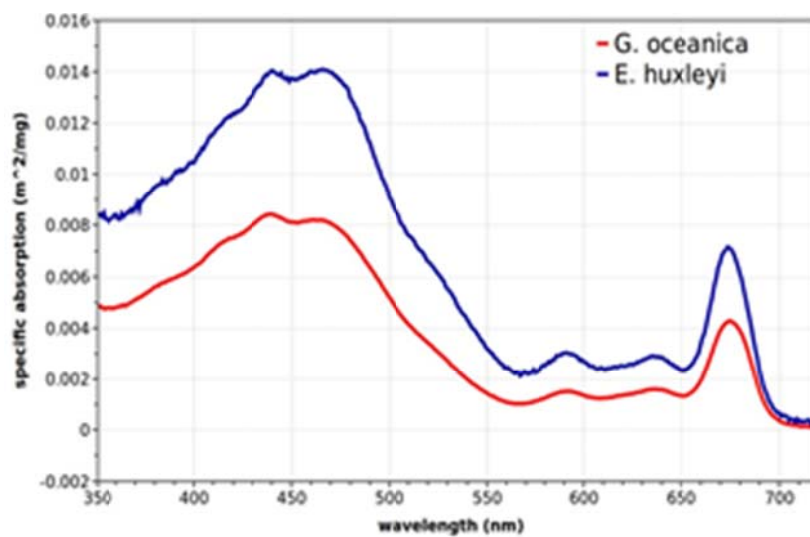


Fig. 5.11 Espectro de absorción de *G. oceánica* y *E. huxleyi*, extraído de Sadegui et al., 2012.

Los valores medidos para estas variables en la trampa de 800 m se muestran en las figuras 5.12 – 5.18.

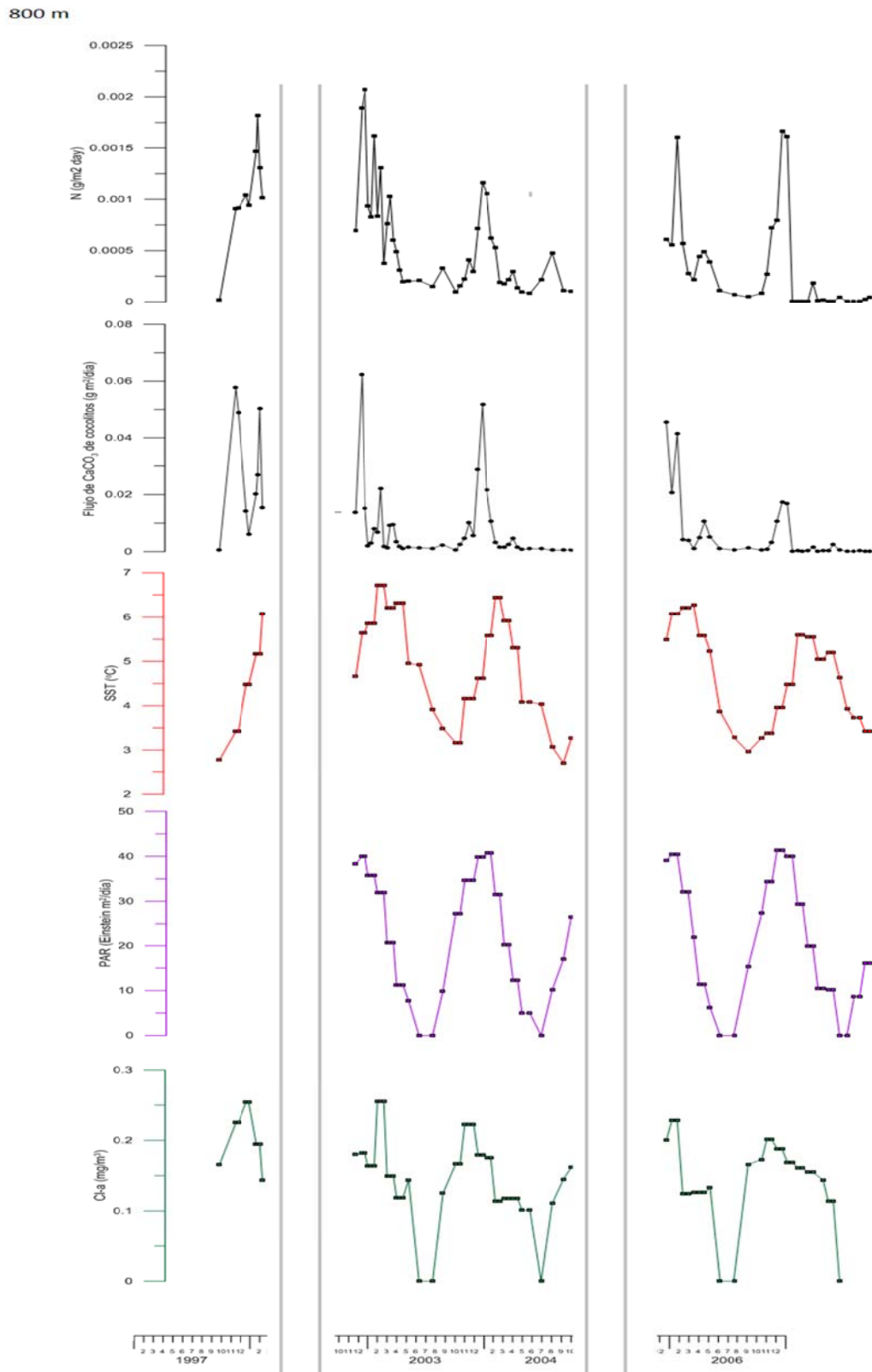


Fig. 5.12 Comparación del flujo de carbonato debido a cocolitos medido con el nitrato, la temperatura superficial (SST), la clorofila-a y la radiación PAR.

Las correlaciones entre estas variables muestran una relación significativa entre el flujo de carbonato debido a cocolitos, el flujo total de carbonato, el nitrato y el índice de radiación PAR:

	<i>Flujo CaCO₃ Cocolitos</i>	<i>Flujo total CaCO₃ <1mm</i>	<i>SST</i>	<i>Cl-a</i>	<i>N</i>	<i>PAR</i>
Flujo CaCO₃ Cocolitos	1,00					
Flujo total CaCO₃ <1mm	0,61	1,00				
SST	0,17	0,50	1,00			
Cl-a	0,39	0,37	0,18	1,00		
N	0,68	0,71	0,27	0,42	1,00	
PAR	0,52	0,49	0,18	0,79	0,58	1,00

Si se compara el flujo de carbonato debido a cocolitos con el contenido de nitrato (figura 5.13), se observa que la correspondencia entre ambas curvas es muy alta al actuar el nitrato como nutriente para *E. huxleyi*, (Paasche, 1997), y siendo un factor determinante en las eclosiones (Joassin et al.,2011).

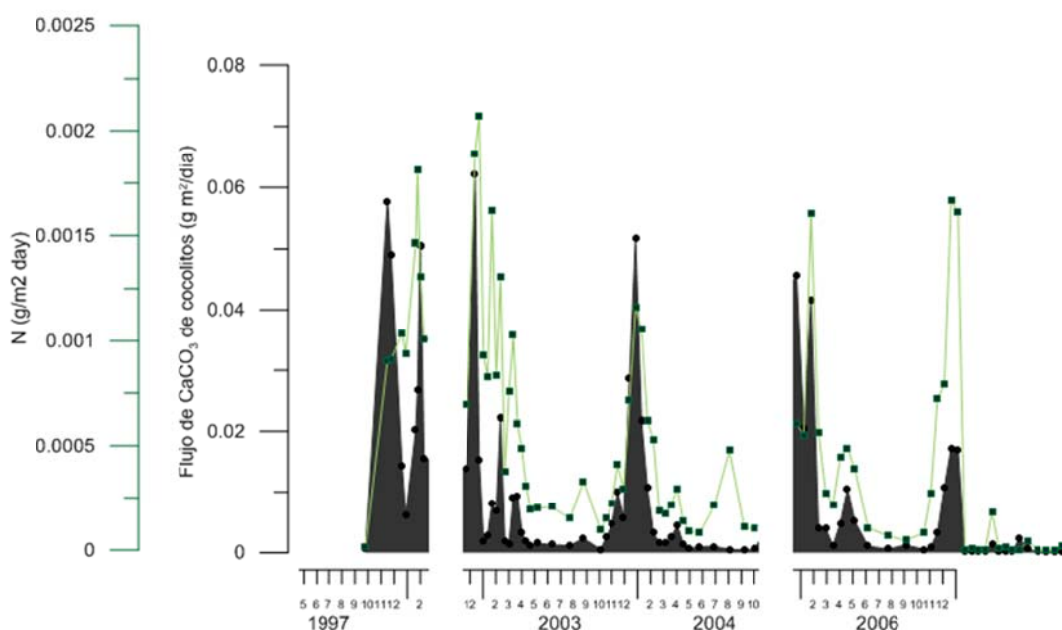


Fig. 5.13 Comparación del flujo de carbonato debido a cocolitos con la concentración de nitrato.

Si se compara el flujo de carbonato debido a cocolitos con la con la concentración de clorofila-a (figura 5.14), se observa cómo, aunque la correspondencia entre ambas curvas es buena, en algunos periodos los máximos de clorofila se adelantan a los máximos de calcita debida a cocolitos, lo que podría indicar que otras especies fotosintéticas, como las diatomeas, estarían también aumentando su población.

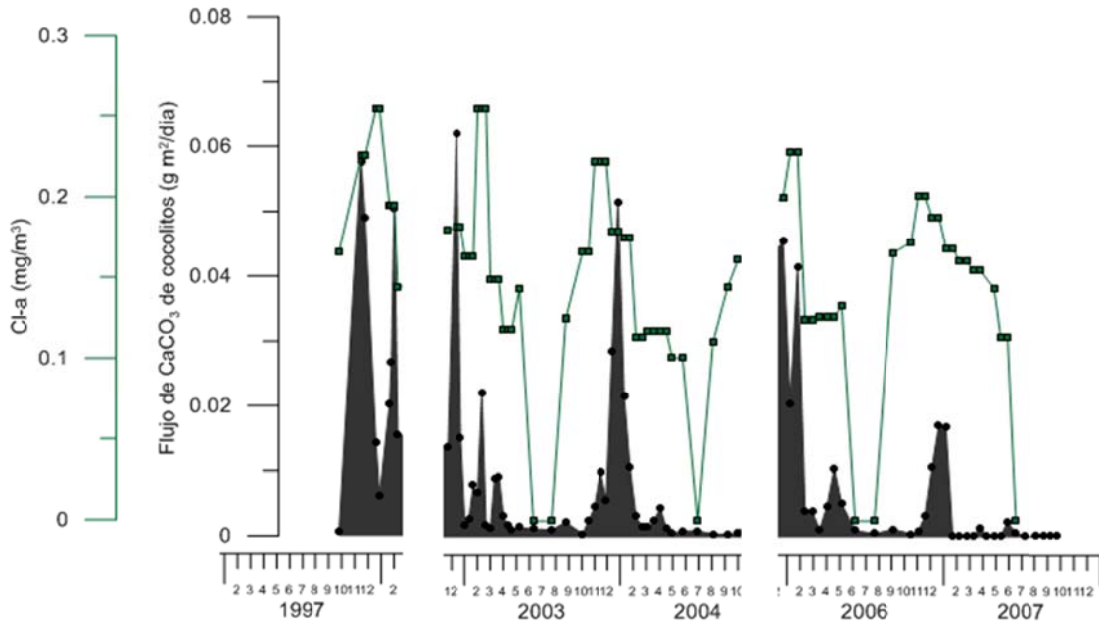


Fig. 5.14 Comparación del flujo de carbonato debido a cocolitos con la concentración de clorofila-a.

Por otra parte, si se representa el flujo de carbonato debido a cocolitos junto con la clorofila-a y con la radiación fotosintética (figura 5.15), se observa cómo los máximos de cocolitos coinciden claramente con los máximos de radiación y que la clorofila aumenta rápidamente a la vez que aumenta la radiación, mientras que la respuesta del flujo de cocolitóforos registrado en las trampas es más lenta, presentando flujos bajos cuando la radiación y la clorofila ya han comenzado a aumentar:

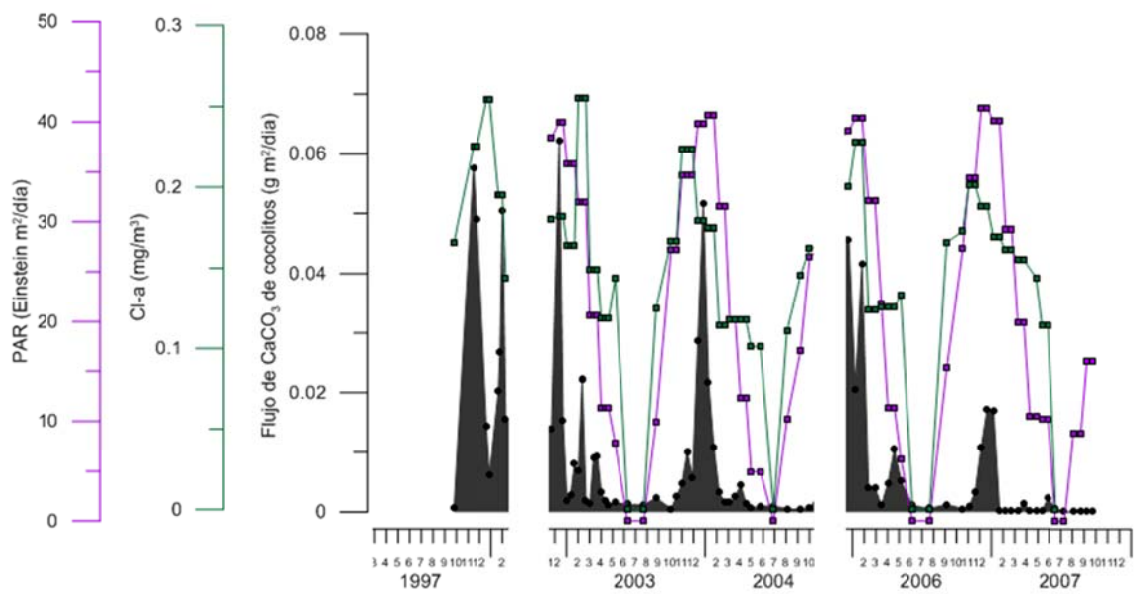


Fig. 5.15 Comparación del flujo de carbonato debido a cocolitos con la concentración de clorofila-a y con la radiación fotosintética PAR.

Representando los promedios mensuales de temperatura superficial (SST) y de PAR comparados con los datos de flujo (figura 5.16), se observa cómo la variación del flujo coincide con la variación de PAR, mientras que la temperatura presenta un desfase de varios días.

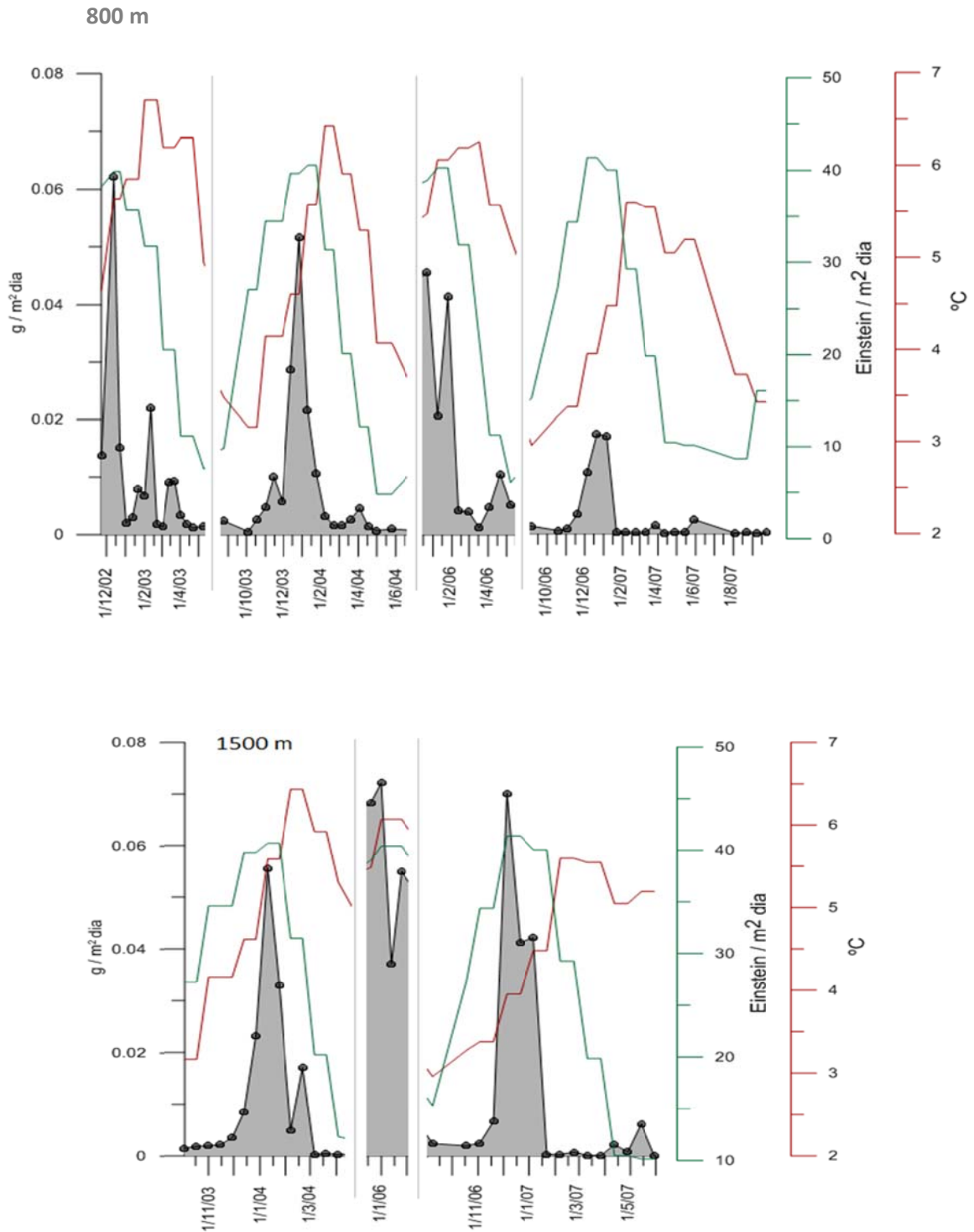


Fig. 5.16 Comparación entre el flujo debido a cocolitos medido (zona sombreada) con la radiación PAR y con la temperatura superficial.

Aunque el aumento de radiación conlleva un aumento de temperatura, la inercia térmica del océano hace que el cambio no sea inmediato. Sin embargo los cocolitóforos responden al aumento de la radiación, coincidiendo ambos máximos, mientras que disminuyen al disminuir la radiación, aunque la temperatura aumente. El desfase entre el máximo de cocolitóforos y la temperatura ya había sido observado en el estudio de las eclosiones (Balch et al., 2014).

Esto hace pensar que un aumento de radiación, junto con la disponibilidad de nitrato, puede desencadenar el aumento de la tasa de reproducción y calcificación de los cocolitóforos, aunque la temperatura aún no haya aumentado, lo que es coherente con el hecho de que la calcificación y la fotosíntesis son procesos que requieren energía y dependen de la luz (Brownlee et al 1995). Cultivos de *E. huxleyi* demuestran que su tasa de crecimiento puede ser cercana a una división al día (Hermoso et al., 2015) lo que hace que en condiciones favorables pueda doblar su población en un solo día, por lo que es de esperar que la respuesta a condiciones ambientales adecuadas sea rápida. En condiciones de laboratorio, cultivos de *Emiliania huxleyi* han mostrado que un aumento de la irradiancia conlleva un gran aumento del tamaño celular y de la tasa de crecimiento, hecho que se observa tanto en condiciones de baja como de alta $p\text{CO}_2$ (Aloisi, 2015, Zonderval et al., 2002, Zonderval 2007). Los resultados obtenidos son coherentes con estas observaciones, en especial con la afirmación de que la luz y los nutrientes son los factores principales que determinan las eclosiones.

Al comparar las mediciones obtenidas para el flujo de calcita debido a cocolitos con el flujo de valvas de diatomeas, publicado en Rigual et al., 2015, se observa cómo la distribución temporal de ambos coincide (figura 5.17).

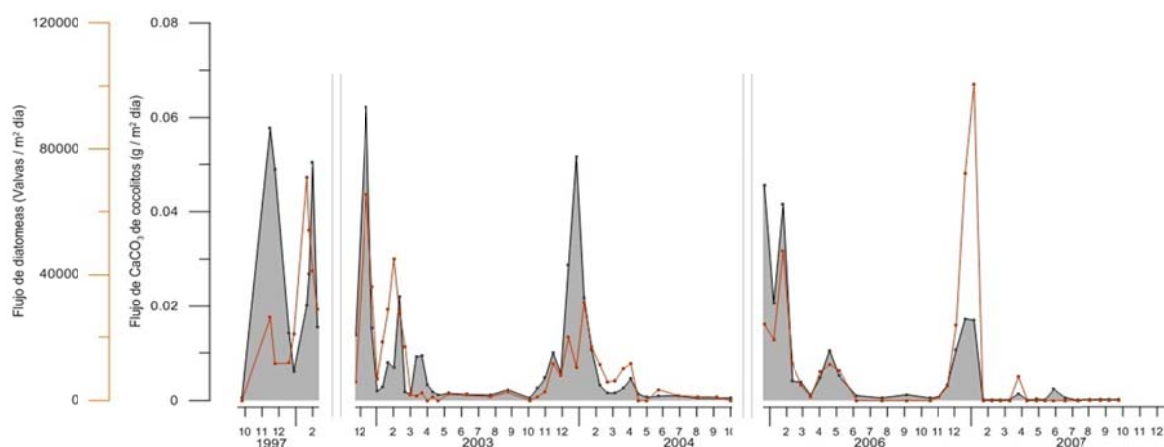


Fig. 5.17 Comparación entre el flujo de carbonato debido a cocolitos y el flujo de valvas de diatomeas (Rigual et al., 2015)

El hecho de que el aumento de los flujos de diatomeas y de cocolitos medidos por la trampa situada a 800 m no coincida con el momento en el que la clorofila aumenta, sino que estén retrasados respecto a ella (figura 5.18) puede deberse tanto a la presencia de organismos fotosintéticos que no forman esqueletos calcáreos o silíceos, como a las diferentes tasas de sedimentación y velocidades de hundimiento de los cocolitos y de las diatomeas. La tasa de hundimiento de las diatomeas varía fuertemente según la especie: mientras que algunas especies sedimentan diariamente entre el 25 y el 50% de su población, en otras tan sólo lo hacen el 1%, lo que origina que la gran mayoría continúe en la columna de agua (Passow, 1991). Su velocidad de hundimiento varía también según la especie, siendo del orden de decenas de metros cada día, lo que hace que puedan tardar más de diez días en alcanzar la trampa. Para los cocolitos, la velocidad de hundimiento es muy pequeña: Bach et han medido para *Emiliania huxleyi* una velocidad de menos de 0.4 m. al día (Bach et al., 2012), lo que implicaría que los cocolitos tardarían centenares de días en alcanzar la trampa, y que serían arrastrados por cualquier corriente horizontal, por lo que los datos recogidos en la trampas, situadas a 800 y a 1500 m. de profundidad, no representarían las condiciones de la columna de agua superior. Sin embargo, la mayoría de cocolitos no sedimentan por sí solos, sino formando parte de pellets fecales de zooplancton, lo que acelera su velocidad hasta varios centenares de metros al día, según sea la especie productora del pellet (Yoon et al., 2011).

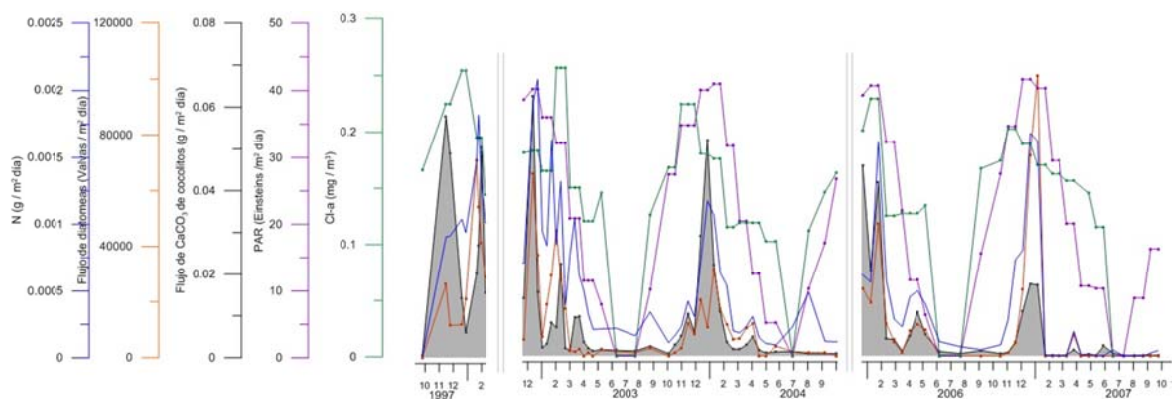


Fig. 5.18 Comparación entre el flujo debido a cocolitos medido (zona sombreada) con el nitrato, el flujo de diatomeas, la radiación PAR y la clorofila-a.

La variación de la profundidad de la capa de mezcla a lo largo del año en ese lugar se puede observar en la figura 5.19, obtenida a partir de las estimaciones de Boyer Montégut et

al. 2004 y 2007 y Mignot et al. 2007. Se observa cómo en los meses correspondientes al verano Austral, la termoclina es más somera, mientras que en los meses de invierno es más profunda.

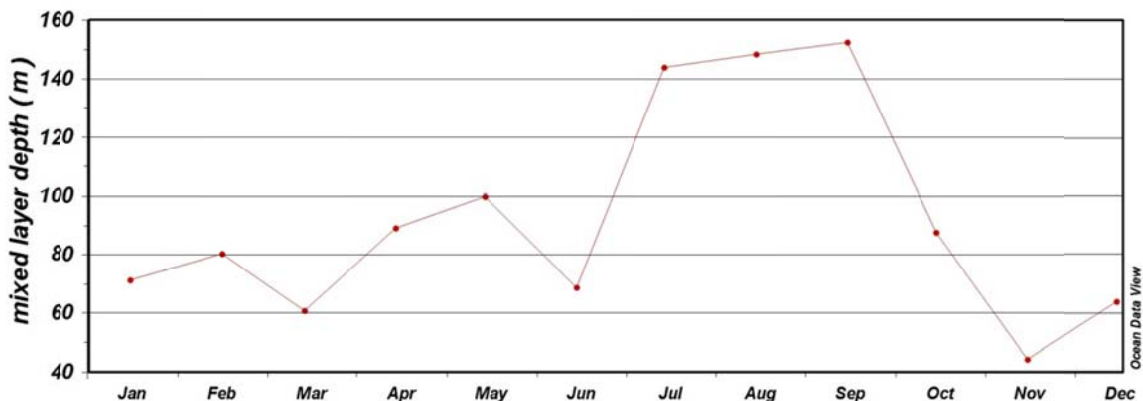


Fig. 5.19 Profundidad de la capa de mezcla, a partir de las estimaciones de Boyer Montégut et al. 2004 y 2007.

Los valores extraídos del World Ocean Atlas 2009 para los valores de temperatura, nitrato, fosfato y saturación de oxígeno a distintas profundidades para los meses de diciembre y julio se muestran en la figura 5.20.

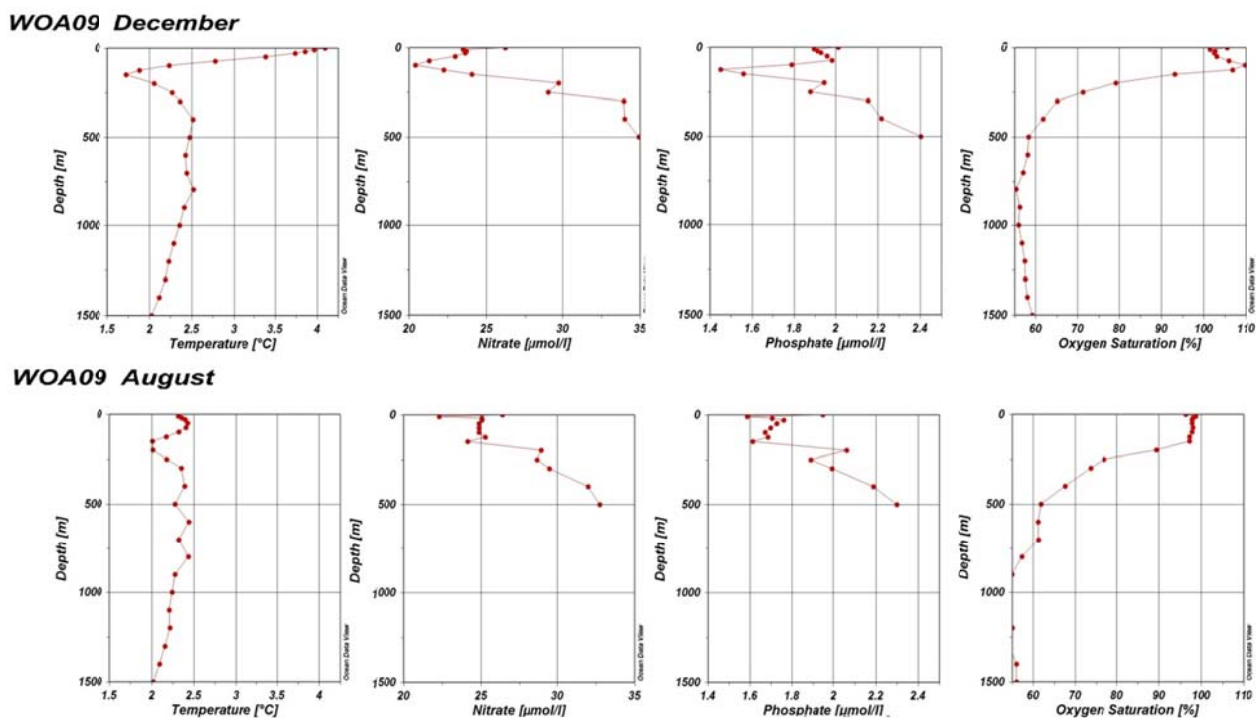


Fig. 5.20 Perfiles verticales de temperatura, nitrato, fosfato y saturación de oxígeno a distintas profundidades. Valores extraídos del World Ocean Atlas 2009.

En ellos se aprecia también una fuerte estacionalidad, destacando el hecho de que, en diciembre a una profundidad de aproximadamente 100 m se aprecia una zona en la que finaliza la capa de mezcla, el nitrato y el fosfato disminuyen y la saturación de oxígeno sobrepasa el 100 %, indicando una alta concentración de productores primarios que sobresaturan el agua de oxígeno.

Los valores observados concuerdan con la evolución estacional de la capa de mezcla en la zona circumpolar antártica descrita por Rintoul y Trull, 2001, quienes concluyeron que en invierno la capa de mezcla se extiende más allá de los 400 m de profundidad, originando la formación de aguas subantárticas, mientras que en verano la profundidad de la capa de mezcla disminuye hasta los 75-100 m lo que hace que el crecimiento del fitoplancton pueda estar limitado por la luz, ya que las concentraciones de nitrato, aunque disminuyan en verano, permanecen por encima de valores que pudieran ser limitantes (Rintoul y Trull, 2001).

La disponibilidad de luz, hierro y sílice son los factores clave que ejercen el control del fitoplancton en las aguas ricas en nitrato del océano Austral (Boyd, 2002). En la zona de estudio existe un fuerte upwelling de aguas profundas ricas en nutrientes como consecuencia del torque que provoca la formación de aguas profundas polares (Sokolov y Rintoul, 2007). Durante el invierno, esta convección activa implica altos niveles de turbulencia que rápidamente homogenizan las propiedades de la columna de agua, lo que se pone de manifiesto en el perfil vertical de la variación de la temperatura con la profundidad, observado en el mes de julio (figura 5.20). Los altos niveles de nutrientes en aguas superficiales son mantenidos por el efecto combinado de la fuerza del viento y la circulación termohalina, y este afloramiento de aguas profundas ricas en nutrientes posibilita que en verano el fitoplancton aumente como consecuencia de una mayor disponibilidad de luz.

Conclusiones

El flujo de carbonato debido a cocolitos se puede estimar a partir del análisis de imágenes de muestras preparadas por decantación. Este método permite discriminar la cantidad de calcita debida a cocolitos de la aportada por otras fuentes. Es una metodología rápida, no destructiva y con trazabilidad, en la que las imágenes utilizadas pueden ser almacenadas y recalculadas si fuera necesario. Los resultados obtenidos son coherentes con los análisis químicos de carbonato total y supone una ventaja respecto a otras técnicas por tener en cuenta factores como los fragmentos de cocolitos o las variaciones de espesor y tamaño dentro de cada especie.

La técnica se ha probado en una trampa de sedimentos, localizada a una longitud de 140° E y a una latitud de 54° S, en la zona del Frente Polar del océano Austral, en la que la asociación de cocolitóforos está fuertemente dominada por la especie *Emiliana huxleyi*, con abundancias relativas de más del 98% en la mayoría de las muestras.

En el caso estudiado, los flujos obtenidos son coherentes con los valores esperados. Presentan una fuerte estacionalidad, con máximos que coinciden con el verano austral. El flujo de carbonato debido a cocolitos responde a las variaciones de nitrato, que actúa como nutriente y de disponibilidad de luz. Los máximos de flujo coinciden, en los periodos en los que existen datos disponibles, con los máximos de radiación fotosintéticamente activa (PAR), lo que estaría en consonancia con los estudios que demuestran que la disponibilidad de nitrato y el flujo de luz están directamente relacionados con la tasa de crecimiento y el tamaño de los cocolitóforos, siendo ambos factores centrales que determinan las eclosiones.

Bibliografía

- Aloisi, G., 2015. Covariation of metabolic rates and cell size in coccolithophores, *Biogeosciences*, 12, 4665–4692, doi:10.5194/bg-12-4665-2015,.
- Anderson, R.F., Chase, Z., Fleisher, M.Q. y Sachs, J., 2002. The Southern Ocean's biological pump during the Last Glacial Maximum. *Deep Sea Research II* 49(9-10), 1909-1938.
- Bach, L.T., Riebesell, U., Sett, S., Febiri, S., Rzepka, P. y Schulz, K.G., 2012. An approach for particle sinking velocity measurements in the 3–400 μm size range and considerations on the effect of temperature on sinking rates. *Marine Biology*, 159, 1853–1864
- Balch, W.M., Drapeau, D.T., Bowler, B.C., Lyczkowski, E.R., Lubelczyk, L. C., Painter, S.C. y Poulton, A.J., 2014. Surface biological, chemical, and optical properties of the Patagonian Shelf coccolithophore bloom, the brightest waters of the Great Calcite Belt. *Limnology and Oceanography*, 59(5), 1715-1732.
- Boyd, P.W., 2002. Environmental factors controlling phytoplankton processes in the Southern Ocean, *J. Phycol.*, 38, 844– 861
- Boyd, P.W., Crossley, A.C., Di Tullio, G.R., Griffiths, F.B., Hutchins, D.A., Queguiner, B., Sedwick, P.N., y Trull, T.W., 2001. Control of phytoplankton growth by iron supply and irradiance in the subantarctic Southern Ocean: Experimental results from the SAZ Project, *J. Geophys. Res.-Oceans*, 106, 31573–31583,
- De Boyer Montégut, C., Madec, G., Fischer, A.S, Lazar, A. y Iudicone, D., 2004. Mixed layer depth over the global ocean: an examination of profile data and a profile-based climatology, *J. Geophys. Res.*, 109.

- De Boyer Montégut, C., Mignot, J., Lazar, A. y Cravatte, S., 2007. Control of salinity on the mixed layer depth in the world ocean: 1. General description, *J. Geophys. Res.*, 112
- Bray, S., Trull, T.W., Manganini, S., 2000. SAZ Project Moored Sediment Traps: Results of the 1997–1998 Deployments. Antarctic Cooperative Research Centre, Hobart, Tasmania, Australia, p. 128.
- Broerse, A.T.C., Ziveri, P., van Hinte, J.E. y Honjo, S., 2000. Coccolithophore export production, species composition, and coccolith-CaCO₃ fluxes in the NE Atlantic (34°N21°W and 48°N 21°W). *Deep Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography* 47, 1877–1905
- Caldeira, K., y Wickett, M. E., 2003. Anthropogenic carbon and ocean pH. *Science*; 425:365.
- Caldeira, K., y Duffy, P.B., 2000. The role of the Southern Ocean in uptake and storage of anthropogenic carbon dioxide, *Science*, 287, 620-622.
- Ebersbach, F., Trull, T.W., Davies, D.M. y Bray, S.G., 2011. Controls on mesopelagic particle fluxes in the Sub-Antarctic and Polar Frontal Zones in the Southern Ocean south of Australia in summer—Perspectives from free-drifting sediment traps. *Deep Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography* 58, 2260-2276.
- Fischer, G., Gersonde, R. y Wefer, G., 2002. Organic carbon, biogenic silica and diatom fluxes in the marginal winter sea-ice zone and in the Polar Front Region: interannual variations and differences in composition. *Deep Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography* 49, 1721-1745.
- Flores, J.A. y Sierro, F.J., 1997. A revised technique for the calculation of calcareous nannofossil accumulation rates. *Micropaleontology* 43, 321-324.
- Flores, J.A., Colmenero-Hidalgo, E., Mejia-Molina, A.E., Baumann, K.H., Henderiks, J., Larsson, K., Prabhu, C.N., Sierro, F.J., y Rodrigues, T., 2010. Distribution of large *Emiliania huxleyi* in the Central and Northeast Atlantic as a tracer of surface ocean dynamics during the last 25,000 years, *Marine. Micropaleontology*, 76, 53–66.
- Geisen, M., Billard, C., Broerse, A.T.C., Cros, L., Probert, I. y Young, J.R., 2002. Life-cycle associations involving pairs of holococcolithophorid species: intraspecific variation or cryptic speciation? *European Journal of Phycology*, 37(4), 531 - 550.

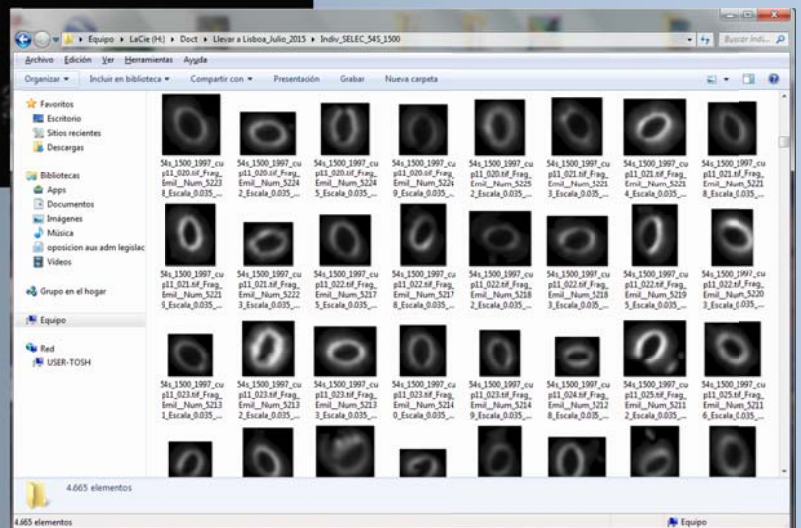
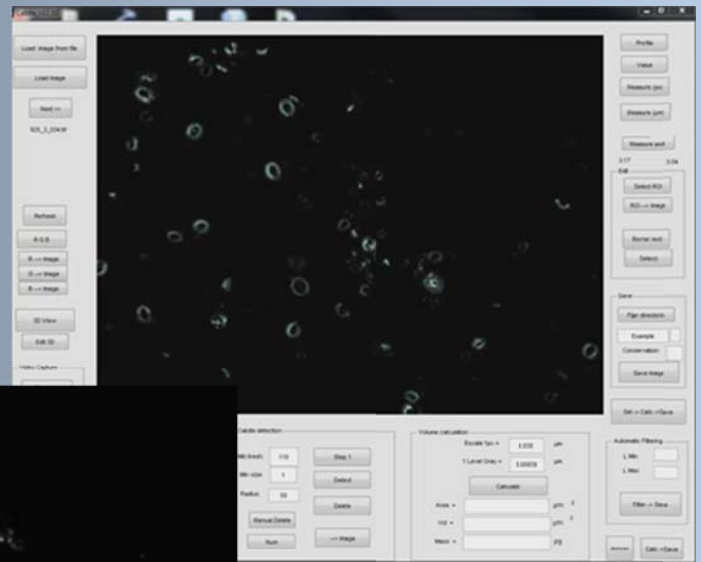
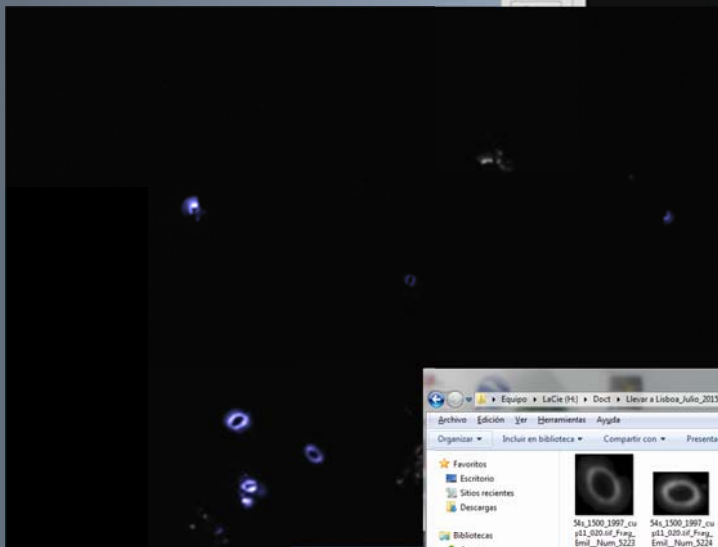
- Giraudeau, J. y Rogers, J., 1994. Phytoplankton biomass and sea-surface temperature estimates from sea-bed distribution of nanofossils and planktonic-foraminifera in the Benguela Upwelling System. *Micropaleontology*, 40(3), 275-285.
- Gravalosa, J., Flores, J.A., Sierro, F. y Gersonde, R., 2008. Sea surface distribution of coccolithophores in the eastern Pacific sector of the Southern Ocean (Bellingshausen and Amundsen Seas) during the late austral summer of 2001. *Marine Micropaleontology*, 69, 16–25.
- Gruber, N., Gloor, M., Mikaloff Fletcher, S.E., Doney, S.C., Dutkeiwicz, S., Follows, M.J., Gerber, M., Jacobson, A.R., Joos, F. y Lindsay, K., 2009. Oceanic sources, sinks, and transport of atmospheric CO₂. *Global Biogeochemical Cycles* 23, GB1005
- Honjo, S., Francois, R., Manganini, S., Dymond, J. y Collier, R., 2000. Particle fluxes to the interior of the Southern Ocean in the Western Pacific sector along 170°W. *Deep Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography* 47, 3521-3548.
- Hwang, J., Kim, M., Manganini, S.J., McIntyre, C.P., Haghypour, N., Park, J., y Eglinton, T.I., 2015. Temporal and spatial variability of particle transport in the deep Arctic Canada Basin. *Journal of Geophysical Research: Oceans*, 120(4), 2784-2799.
- Joassin, P., Delille, B., Soetaert, K., Harlay, J., Borges, A., Chou, L., Riebesell, U., Suykens, K. y Gregoire, M., 2011. Carbon and nitrogen flows during a bloom of the coccolithophore *Emiliana huxleyi*: Modelling a mesocosm experiment. *Journal Marine Systems*, 85, 71–85.
- Knappertsbusch, M., Cortes, M.Y. y Thierstein, H.R., 1997. Morphologic variability of the coccolithophorid *Calcidiscus leptoporus* in the plankton, surface sediments and from the Early Pleistocene. *Marine Micropaleontology*, 30(4), 293-317.
- Mergulhao, L.P., Guptha, M.V.S., Unger, D. y Murty, V.S.N., 2013. Seasonality and variability of coccolithophore fluxes in response to diverse oceanographic regimes in the Bay of Bengal: Sediment trap results. *Palaeogeogr. Palaeoclimatol. Palaeoecol.*, 371, 119–135
- Mignot, J., de Boyer Montégut, C., Lazar, A. y Cravatte, S., 2007. Control of salinity on the mixed layer depth in the world ocean: 2. Tropical areas, *J. Geophys. Res.*, 112.
- Okada, H. y Honjo, S., 1973. The distribution of oceanic coccolithophorids in the Pacific. *Deep-Sea Research*, 20, 355-374.

- Okada, H., y McIntyre, A., 1979. Seasonal distribution of modern coccolithophores in the western North Atlantic Ocean. *Marine Biology*, 54(4), 319-328.
- Passow, U., 1991. Species-specific sedimentation and sinking velocities of diatoms. *Marine Biology*, 108, 449–455
- Paasche, E., 1998. Roles of nitrogen and phosphorus in coccolith formation in *Emiliania huxleyi* (Prymnesiophyceae). *European Journal of Phycology*, 33:1, 33-42
- Quinn, P.S., Sáez, A.G., Baumann, K.H., Steel, B.A., Sprengel, C. y Medlin, L.K., 2004. Coccolithophorid biodiversity: evidence from the cosmopolitan species *Calcidiscus leptoporus*, in *Coccolithophores, from Molecular Processes to Global Impact*, edited by H. R. Thierstein and J. R. Young, pp. 299 - 326, Springer.
- Rigual-Hernández, A.S., Trull, T.W., Bray, S.G., Closset, I., y Armand, L.K., 2015. Seasonal dynamics in diatom and particulate export fluxes to the deep sea in the Australian sector of the southern Antarctic Zone. *J. Mar. Sys.*, 142, 62–74.
- Rintoul, S.R., y Trull, T.W., 2001. Seasonal evolution of the mixed layer in the Subantarctic Zone south of Australia. *J. Geophys. Res.*, 106, 31447–31462
- Sabine, C.L., Feely, R.A., Gruber, N., Key, R.M., Lee, K., y otros, 2004. The oceanic sink for anthropogenic CO₂. *Science*, 305, 367–71
- Siedler, G., Griffies, S.M., Gould, J. y Church, J.A. (Ed.), 2013. Ocean circulation and climate: A 21st century perspective. 2nd Edition. International Geophysics Series, 103. Academic Press: Oxford, Amsterdam.
- Sadeghi, A., Dinter, T., Vountas, M., Taylor, B., Altenburg-Soppa, M. y Bracher, A., 2012. Remote sensing of coccolithophore blooms in selected oceanic regions using the PhytoDOAS method applied to hyper-spectral satellite data. *Biogeosciences*, 9(6), 2127-2143.
- Sokolov, S. y Rintoul, S.R., 2007. On the relationship between fronts of the Antarctic Circumpolar Current and surface chlorophyll concentrations in the Southern Ocean. *J. Geophys. Res.*, 112, C07030.

- Timothy, D.A., Wong, C.S., Barwell-Clarke, J.E., Page, J.S., White, L.A. y Macdonald, R.W., 2013. Climatology of sediment flux and composition in the subarctic Northeast Pacific Ocean with biogeochemical implications. *Prog. Oceanogr.*, 116, 95–129.
- Tomczak, M. y Godfrey, J.S., 2003. *Regional Oceanography: an Introduction* 2nd ed. Daya Publishing House.
- Trull, T.W., Bray, S.G., Manganini, S.J. y Francois, R., 2001. Moored sediment trap measurements of carbon export in the Subantarctic and Polar Frontal Zones of the Southern Ocean, south of Australia. *J. Geophys. Res.*, 106, 31489-31509.
- Trull, T.W., Schulz, E., Bray, S.G., Pender, L., McLaughlan, D., Tilbrook, B., Rosenberg, M. y Lynch, T., 2010. The Australian Integrated Marine Observing System Southern Ocean Time Series facility. *Oceans 2010 IEEE - Sydney*, 24–27 May 2010, 1–7.
- Westbroek, P., Brown, C.W., van Bleijswijk, J., Brownlee, C., Brummer, G.J., Conte, M., Egge, J., Fernandez, E., Jordan, R., Knappersbusch, M., Stefels, J., Veldhuis, M., van der Wal, P. y Young, J., 1993. A model system approach to biological climate forcing. The example of *Emiliana huxleyi*. *Global and Planetary Change*, 8, 27–46.
- Winter, A., Jordan, R.W. y Roth, P.H., 1994. Biogeography of living coccolithophores in ocean waters, in *Coccolithophores*, edited by A. Winter and W. G. Siesser, pp. 161-178, Cambridge University Press, Cambridge.
- Yoon, W.D., Kim, S.K. y Han, K.N., 2001. Morphology and sinking velocities of fecal pellets of copepod, molluscan, euphausiid, and salp taxa in the northeastern tropical Atlantic. *Marine Biology*, 139, 923-928.
- Young, J., Geisen, M., Cros, L., Kleijne, A., Sprengel, C., Probert, I. y Ostergaard, J., 2003. A guide to extant coccolithophore taxonomy. *Journal of Nannoplankton Research*, Special Issue 1, 125 pp.
- Young, J. y Westbroek, P. 1991. Genotypic variation in the coccolithophorid species *Emiliana huxleyi*. *Marine Micropaleontology*, 18, 5-23.
- Young, J.R. y Ziveri, P., 2000. Calculation of coccolith volume and its use in calibration of carbonate flux estimates. *Deep-Sea Research Part II-Topical Studies in Oceanography*, 47, 1679-1700.

Young, J.R., y Bown, P.R., 1997, Cenozoic calcareous nannoplankton classification. *Journal of Nannoplankton Research*, 19(1), 15-47.

Young, J.R., Geisen, M., Cros, L., Kleijne, A., Sprengel, C., Probert, I. y Østergaard, J., 2003. A guide to extant coccolithophore taxonomy. *Journal of Nannoplankton Research*, 125.



Capítulo VI

Variaciones de espesor y masa de los cocolitos de *Emiliana huxleyi* en la zona del Frente Polar del Océano Austral

Capítulo VI: Variaciones de espesor y masa de los cocolitos de *Emiliana huxleyi* en la zona del Frente Polar del océano Austral

Introducción

Una de las ventajas principales del análisis de imágenes de cocolitos tomadas utilizando luz polarizada circular es que posibilita la medición de la masa y el espesor de cocolitos individuales reales, frente a otras estimaciones como la de Young y Ziveri (2000) que proporciona estimaciones basadas en cocolitos ideales, sin tener en cuenta variaciones en el espesor debidas a factores como la disolución o las diversas respuestas biológicas a la variación de parámetros ambientales. En el capítulo cuarto se presentaron los resultados obtenidos para varias especies de cocolitos, mostrando su coherencia con las estimaciones que se habían hecho utilizando otras técnicas, pero sin tener en cuenta cuestiones oceanográficas, más allá de la descripción del lugar en el que las muestras analizadas habían sido recogidas.

Por ello, en el presente capítulo se pretende mostrar el potencial de la técnica a la hora de analizar de forma individual las variaciones de espesor y masa de los cocolitos en un contexto oceanográfico real. Por ser un tema de gran trascendencia, se ha elegido la especie

Emiliana huxleyi, que es la más abundante de los océanos, en una zona de gran interés oceanográfico, como es el océano Austral.

De manera global el PH de los océanos está disminuyendo como consecuencia de la disolución de CO₂ atmosférico. En el caso particular del océano Austral la disminución del PH registrada en las últimas décadas hace pensar que las zonas al sur del Frente Polar podían alcanzar valores de carbonato por debajo de la saturación a mediados del siglo o incluso antes (Orr et al. 2005; Steinacher et al. 2009, McNeil y Matear, 2008). Concentraciones por debajo de la saturación podrían dificultar o incluso impedir la calcificación a muchos organismos marinos que utilizan el carbonato para desarrollar estructuras biológicas, como los cocolitóforos. Por ello es importante conocer la respuesta biológica de los cocolitóforos a las condiciones variables de PH, para saber en qué medida pueden verse afectados por ellas.

Emiliana huxleyi es la especie de cocolitóforo más abundante y por esta razón muchos estudios de han centrado en ella. Se trata de una especie cosmopolita que ha sido observada en un amplio rango de temperaturas y salinidades, desde los trópicos hasta los océanos polares, en los que está expandiéndose (Winter et al., 2013). Grandes flujos de esta especie han sido documentados en aguas ricas en nutrientes, a lo largo de los bordes de las zonas de giro subtropical, en zonas de upwelling y a lo largo de los bordes de las plataformas continentales (Winter y Siesser, 2006). Tiene varios morfotipos, relacionados con variaciones en su genotipo, que implican variaciones en su tamaño, forma y grado de calcificación. (Young y Westbroek, 1991), habiendo sido la mayor de 4 µm utilizada en reconstrucciones paleoclimáticas como un indicador de aguas frías en el Atlántico Norte (Flores et al., 2010).

Meier et al. (2014) han estudiado la variación en el espesor de los cocolitos de *Emiliana huxleyi* en el Mediterráneo Occidental, estudiando una serie de muestras recogidas mediante trampas de sedimentos en el periodo 1993-2005 (con varias discontinuidades) y comparándolas con muestras procedentes del fondo y de testigos, encontrando una disminución continua en la masa promedio de los cocolitos en el periodo 1993-2005, alcanzando niveles inferiores a los de a época pre-industrial, concluyendo que esta disminución es probablemente debida a cambios en el sistema del carbonato.

Emiliana huxleyi responde rápidamente a las variaciones de CO₂ (Barcelos e Ramos et al., 2004), y en primera instancia se esperaría que una disminución en el PH oceánico implicaría variaciones en la calcificación. Algunos trabajos tempranos de cultivo en laboratorio sugirieron que podría haber una reducción en las tasas de calcificación al aumentar la presión

parcial de CO₂ (e.g. Riebesell et al., 2000, Engel et al., 2005). Sin embargo también manifestaron que efectos como la tasa de crecimiento y cambios en el tamaño de la célula podían hacer confusa esta relación, llegando incluso a cambiarla, y pudiendo ser de menor importancia que otros factores, como el nitrógeno (Müller et al., 2012) y que se deberían buscar cambios en la ratio de calcificación y en las tasas de calcificación por célula. Varios estudios sugirieron que variaciones en el estado de saturación del carbonato podrían influenciar la distribución de los cocolitóforos modernos, explicando cuestiones como la época de las eclosiones (Merico et al 2006), y la ausencia de cocolitóforos en algunas partes de océano Antártico (Cubillos et al.,2007).

Pero otros estudios muestran que la respuesta de los cocolitóforos al carbonato es mucho más compleja, ya que resultados opuestos se han obtenido en el estudio de alta resolución de sedimentos, mostrando incrementos en la masa de los cocolitos en los últimos siglos a pesar del aumento en CO₂ atmosférico, (Iglesias - Rodríguez et al., 2008; Grelaud et al.,2009), estudios en la bahía de Vizcaya muestran que el descenso invernal en la saturación del carbonato es simultáneo a un incremento de la calcificación en *E. huxleyi*. (Smith et al., 2012), e incluso durante el Holoceno la masa de los cocolitos ha variado significativamente, aunque se piensa que las concentraciones de CO₂ han sido relativamente estables (Berger et al., 2012).

Recientemente, Young et al., 2014, han estudiado el tamaño y el grado de calcificación de cocolitos de *Emiliana huxleyi* a partir de muestras recogidas alrededor de las Islas Británicas y sometidas a ensayos variando la $p\text{CO}_2$. Ni en las muestras recogidas ni en las tratadas en laboratorio se vio una correlación significativa entre la morfología y el estado de saturación. Mientras que las muestras de laboratorio sometidas a elevada $p\text{CO}_2$ vieron reducida la tasa de crecimiento, la morfología no se vio afectada significativamente, incluso en condiciones de concentración muy altas (1000 $\mu\text{atm } p\text{CO}_2$). Las variaciones en muestras naturales las atribuyen a variaciones en el genotipo de poblaciones, en lugar de a respuestas a variaciones en la $p\text{CO}_2$.

El hecho de que la respuesta de *Emiliana huxleyi* a las variaciones de CO₂ parece no ser uniforme hace pensar que podría haber otros factores, además de la acidificación, como la temperatura o los nutrientes, que podrían actuar de forma conjunta condicionando las respuestas fisiológicas implicadas en la calcificación (Horigone et al., 2014).

Metodología

Se han utilizado las mismas muestras e imágenes que se habían utilizado previamente para el cálculo de flujo de carbonato debido a cocolitos, es decir, entre 25 y 30 imágenes de cada muestra, siendo un total de 4059 imágenes.

De manera automática con el programa C-Calcita se han seleccionado todos los fragmentos con un tamaño superior a 1,4 μm . El programa los selecciona realizando previamente un filtro basado en un nivel de gris umbral definido por el usuario, con el fin de eliminar el ruido presente en la imagen, y realizando posteriormente una erosión y una dilatación de cada fragmento de la imagen para poder así separar los fragmentos que estén muy cerca unos de otros. Luego los recorta y mide su eje mayor, eje menor, área, volumen y masa, almacenando cada imagen individual junto con toda esta información.

Visualmente se han seleccionado los fragmentos que se correspondían con cocolitos de *Emiliana huxleyi*, completos y bien enfocados, para posteriormente volcar toda la información en una hoja Excel, en la que el espesor medio de cada cocolito se calcula dividiendo la masa entre el área.

Como el número de cocolitos presente en cada imagen no es uniforme, la cantidad medida para cada periodo tampoco lo ha sido. En la tabla 6.1 se detallan el número de cocolitos medidos para cada mes. En total se han medido 8766 cocolitos de *Emiliana huxleyi*.

Año y mes	Nº medido
1997	941
9	46
10	56
11	378
12	461
1998	595
1	509
2	86
2001	322
11	78
12	244
2002	286
1	114
11	16
12	156
2003	1292
1	65
2	146
3	77
4	29
5	34
6	25
7	34
8	30
10	77
11	196
12	579
2004	1416
1	858
2	289
3	75
4	83
5	40
6	27
8	17
9	16
10	11
2005	624
12	624
2006	2661
1	989
2	112
3	15
4	190
5	86
6	35
7	9
9	63
10	48
11	195
12	919
2007	629
1	496
2	42
3	32
4	29
5	13
6	15
7	2
Total	8766

Tabla 6.1. Número de cocolitos de *Emiliana huxleyi* medidos cada mes.

Resultados y análisis

Los valores obtenidos para el espesor, masa y tamaño (longitud del eje mayor), se muestran en la figura 6.1, donde las líneas muestran la desviación estándar de cada punto. Como se puede observar, las desviaciones son relativamente grandes, representando de media un 13% para el espesor, un 47% para la masa y un 18% para el tamaño. Estos valores no deben ser entendidos como una muestra del error, sino que dan una idea de cómo es la distribución de los datos y su dispersión.

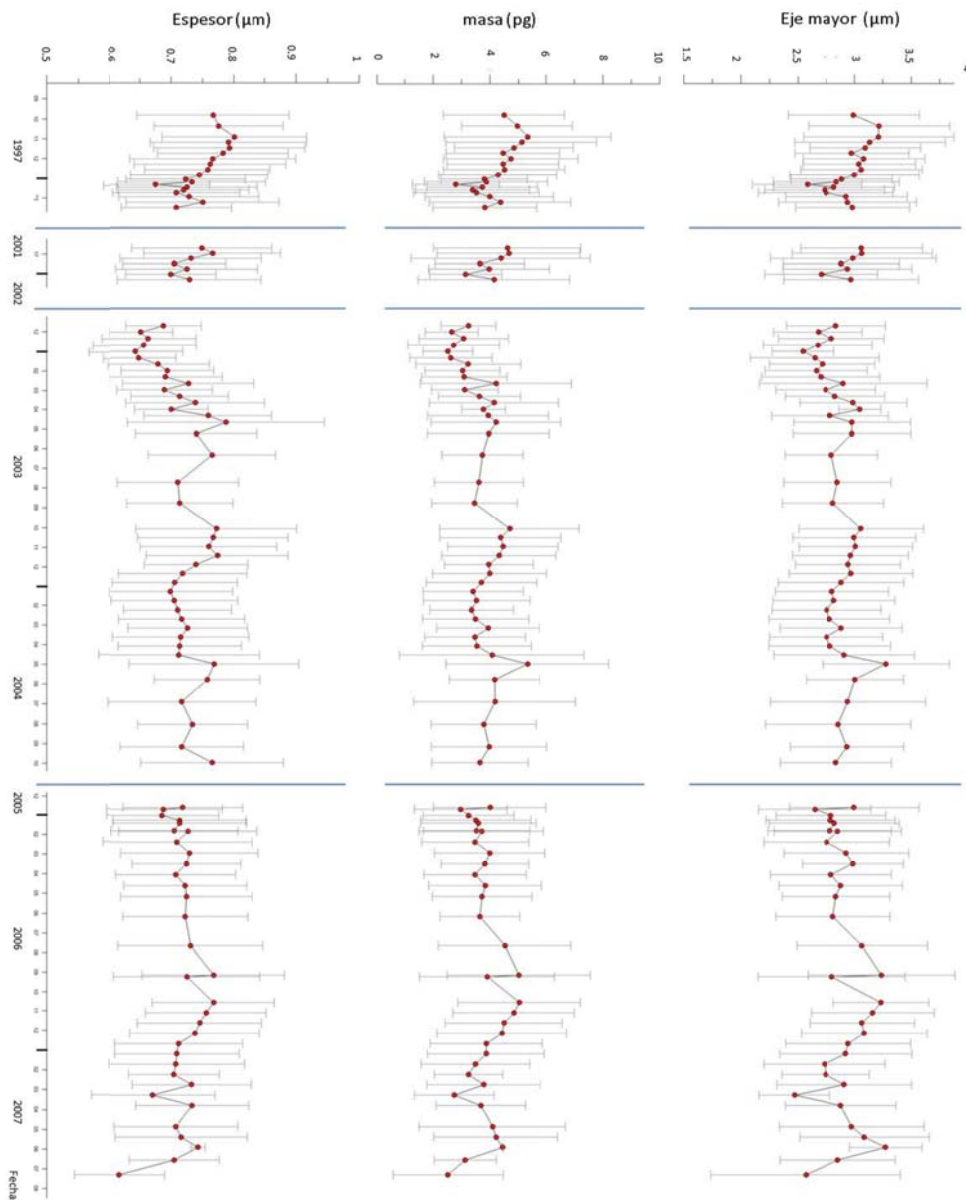


Fig. 6.1 Variación del espesor, masa y longitud de los cocolitos de *Emiliana huxleyi* a lo largo del tiempo

Con el fin de mostrar la dispersión de las medidas de espesor obtenidas agrupadas por meses se ha realizado un gráfico de tipo diagrama de cajas (“Box and Whisker”), mostrado en la figura 6.2 en el que se representa el valor máximo, mínimo, la mediana, el cuartil inferior y el superior. La mediana es representada por la línea horizontal que divide cada caja. A continuación, en la figura 6.3 y en la tabla 6.2 se muestran la forma de la distribución de las tres magnitudes y los estadísticos descriptivos de cada una.

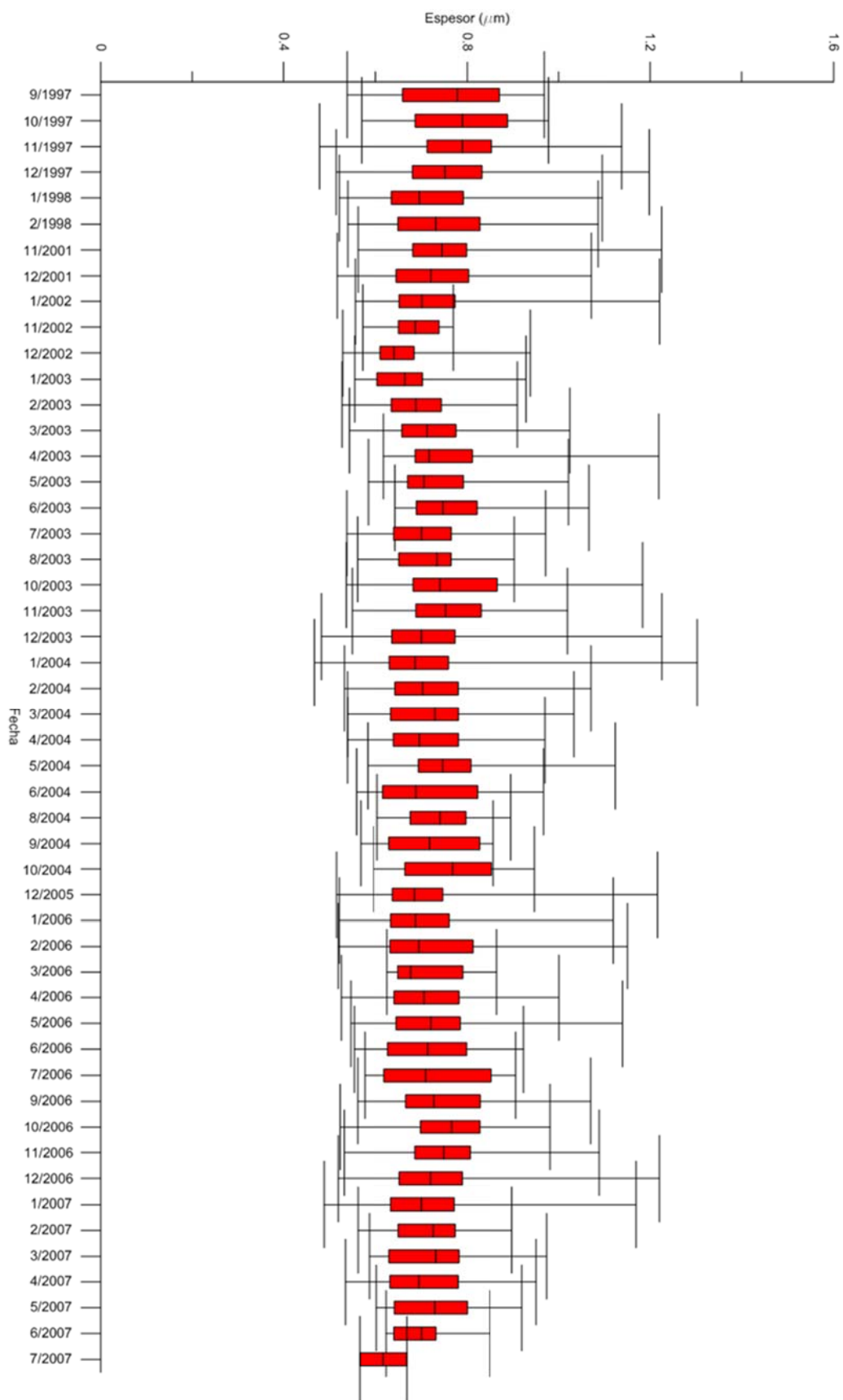


Fig. 6.2 Gráfico de cajas de las mediciones de espesor de los cocolitos de *Emiliana huxleyi*.

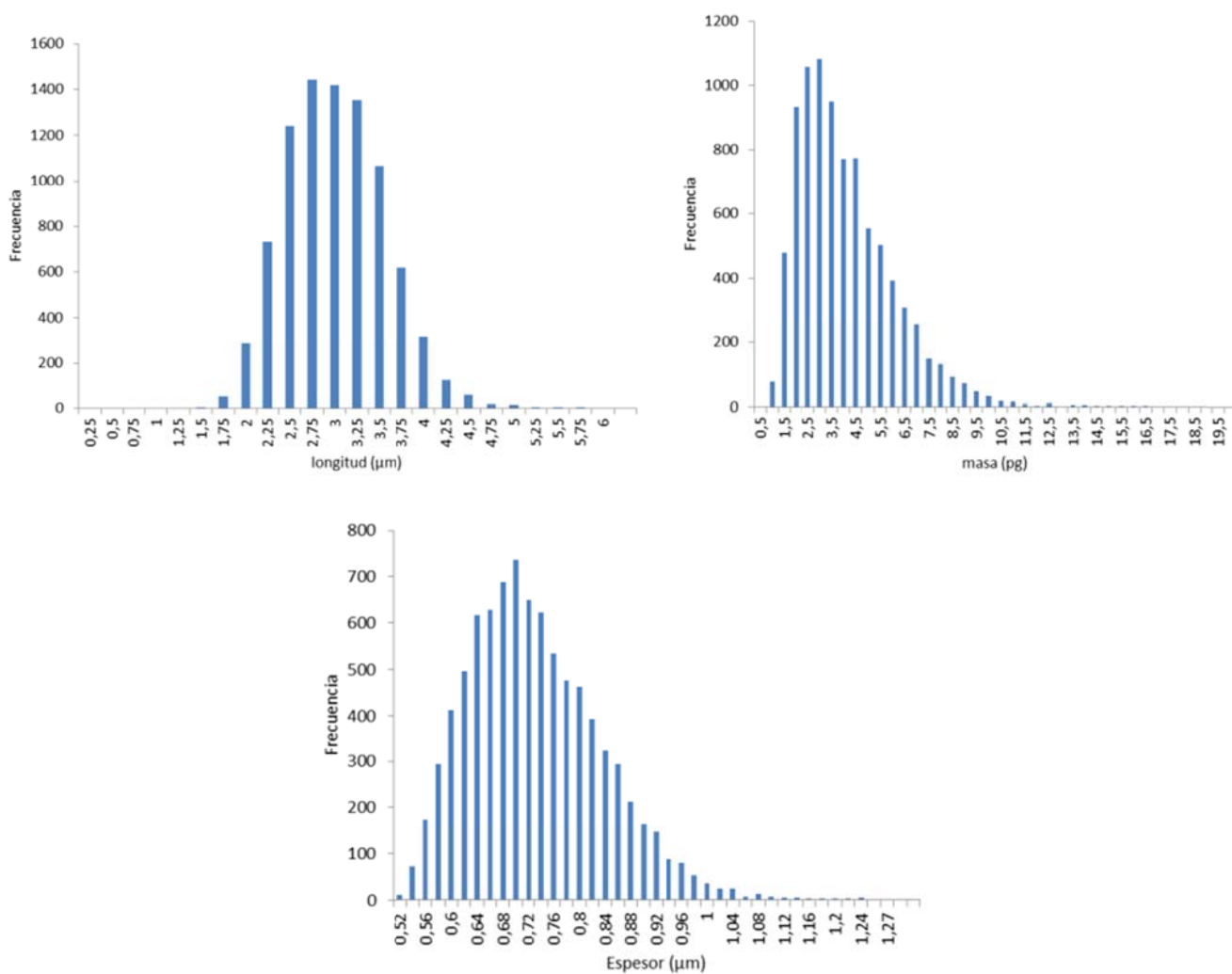


Fig. 6.3 Distribuciones de las medidas de longitud, masa y espesor de los cocolitos medidos.

	Longitud (μm)	Masa (pg)	Espesor (μm)
Media	2,89	3,83	0,72
Error típico	0,01	0,02	0,00
Mediana	2,86	3,41	0,71
Moda	3,11	2,59	0,67
Desviación estándar	0,55	2,05	0,10
Varianza	0,30	4,18	0,01
Curtosis	0,27	4,09	0,80
Coefficiente de asimetría	0,39	1,49	0,73
Rango	4,81	18,71	0,84
Mínimo	1,40	0,59	0,47
Máximo	6,21	19,30	1,30
Número	8765	8765	8765

Tabla 6.2 Estadísticos básicos de las medidas de longitud, masa y espesor de los cocolitos medidos.

Las tres magnitudes están, como era de esperar, fuertemente correlacionadas:

	Espesor	Masa	Eje mayor
Espesor	1		
Masa	0,8895597	1	
Eje mayor	0,77090428	0,93379151	1

Las correlaciones de 0,88 entre la masa y el espesor; y 0,93 entre la masa y el tamaño indican una fuerte dependencia entre estas magnitudes. Como se aprecia en la figura 6.4, su relación se corresponde con una función cuadrática, en coherencia con la relación matemática entre ambas, ya expuesta en el capítulo cuarto. Sin embargo la correlación del espesor con el tamaño es algo menor, lo que hace pensar que el espesor no esté totalmente condicionado por el tamaño, pudiendo haber otros factores que influyan en su variación.

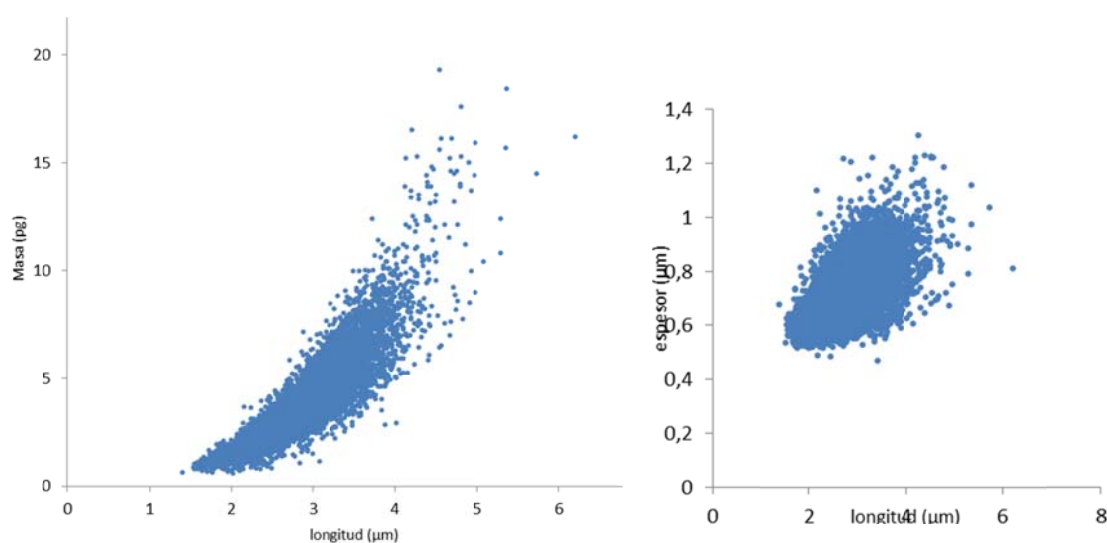


Fig. 6.4 Relación entre la masa y la longitud (izquierda) y entre el espesor y la longitud (derecha) de los cocolitos medidos.

Comparación con otras variables

Si se toman los valores medios de las longitudes de los ejes y de los espesores para cada muestra a 800 m de profundidad y se calcula la correlación de estas magnitudes con otras variables físico-químicas, se obtienen los valores mostrados en la siguiente tabla:

		Eje_Mayor	Eje_menor	Masa	Espesor	SST	PH	Cl_a	Sal	N
Eje_Mayor	Pearson Correlation Sig. (2-tailed)	1	,900(**) 0,000	,929(**) 0,000	,681(**) 0,000	-,419(**) 0,000	0,160 0,166	-0,100 0,388	0,136 0,237	-,290(*) 0,010
Eje_menor	Pearson Correlation Sig. (2-tailed)	,900(**) 0,000	1	,965(**) 0,000	,750(**) 0,000	-,465(**) 0,000	0,197 0,087	-0,068 0,555	0,136 0,237	-,316(**) 0,005
Masa	Pearson Correlation Sig. (2-tailed)	,929(**) 0,000	,965(**) 0,000	1	,827(**) 0,000	-,442(**) 0,000	0,190 0,099	-0,052 0,651	0,169 0,142	-,327(**) 0,004
Espesor	Pearson Correlation Sig. (2-tailed)	,681(**) 0,000	,750(**) 0,000	,827(**) 0,000	1	-,416(**) 0,000	,230(*) 0,044	-0,010 0,931	0,212 0,064	-,380(**) 0,001
SST	Pearson Correlation Sig. (2-tailed)	-,419(**) 0,000	-,465(**) 0,000	-,442(**) 0,000	-,416(**) 0,000	1	0,003 0,976	0,089 0,442	-0,158 0,171	,243(*) 0,033
PH	Pearson Correlation Sig. (2-tailed)	0,160 0,166	0,197 0,087	0,190 0,099	,230(*) 0,044	0,003 0,976	1	0,204 0,075	0,184 0,109	0,054 0,643
Cl_a	Pearson Correlation Sig. (2-tailed)	-0,100 0,388	-0,068 0,555	-0,052 0,651	-0,010 0,931	0,089 0,442	0,204 0,075	1	0,045 0,695	,463(**) 0,000
Sal	Pearson Correlation Sig. (2-tailed)	0,136 0,237	0,136 0,237	0,169 0,142	0,212 0,064	-0,158 0,171	0,184 0,109	0,045 0,695	1	-0,144 0,212
N	Pearson Correlation Sig. (2-tailed)	-,290(*) 0,010	-,316(**) 0,005	-,327(**) 0,004	-,380(**) 0,001	,243(*) 0,033	0,054 0,643	,463(**) 0,000	-0,144 0,212	1

** . Correlación significativa a nivel 0,01.

* . Correlación significativa a nivel 0,05.

Tabla 6.3 Correlaciones entre las variables morfológicas medidas y las variables ambientales.

En el caso del espesor, además de las altas correlaciones positivas con la masa y con los ejes mayor y menor, consistentes con el hecho de que a medida que el cocolito crece su espesor también aumenta, se observan correlaciones significativas, si bien bastante bajas, positiva con el PH (0,23), y negativas con el nitrato (-0,38) y la temperatura superficial (-0,41).

El hecho de que estas correlaciones no sean demasiado altas, junto con la gran dispersión de los datos, hace que estos resultados deban ser analizados con cautela, pues puede que no exista una relación directa entre los parámetros señalados, sino una relación más compleja, con algún factor subyacente que haga que las magnitudes observadas varíe de la forma medida.

La correlación negativa del espesor con el nitrato se podría explicar a partir del hecho de que cuando el cocolito aumenta lo hace a costa del nitrato, por lo que un aumento de la masa y del espesor de los cocolitos llevaría asociado una disminución en el nitrato.

Por otra parte, la correlación negativa entre el espesor (y la masa) con la temperatura, junto con la de los ejes, indicaría que, al disminuir la temperatura los cocolitos se harían más pequeños y delgados. *Emiliania huxleyi* es una especie cosmopolita, que se ha adaptado a vivir en un amplio rango de temperaturas. Varios estudios han relacionado su tamaño con la temperatura y con la salinidad, con el fin de poderlos utilizar como proxies para reconstrucciones paleoclimáticas (e.g. Fielding et al., 2009, Bach et al 2012). Recientemente Horigome et al., 2014, han analizado los factores que controlan la masa de los cocolitos de *Emiliania huxleyi* a partir de muestras recogidas principalmente en diferentes lugares del Atlántico Sur y del océano Ártico. Al igual que ocurre en nuestro caso, sus valores presentan una gran dispersión. En las muestras pertenecientes al océano Austral, obtienen también una correlación negativa entre el nitrato y la masa, mayor que la obtenemos en nuestro estudio. Por el contrario, obtienen una correlación positiva entre la masa y la temperatura, si bien en la zona correspondiente al giro del Atlántico Sur la correlación es negativa, aún mayor que la que se obtiene en los datos analizados en este estudio.

La correlación significativa, aunque baja, entre el PH y el espesor es el resultado de mayor interés, por la trascendencia que tiene el conocer cómo la disminución del PH oceánico afectará a los organismos calcificadores. Según los valores obtenidos, una disminución en el PH implicaría una disminución en el espesor, como se muestra en la figura 6.5.

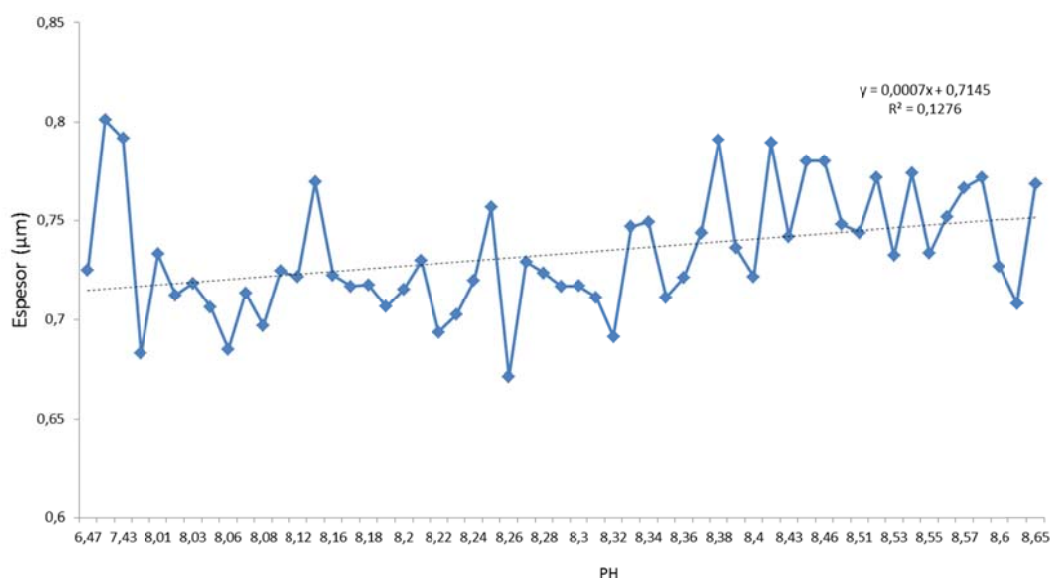


Fig. 6.5 Variación del espesor con el PH y línea de tendencia.

Se debe destacar el hecho de que el PH no se correlacione de manera significativa con el tamaño de los cocolitos (es decir, con la longitud medida de sus ejes), lo que estaría en consonancia con Young et al., 2014, quienes a partir del estudio con microscopio electrónico de muestras recogidas alrededor de las Islas Británicas y de varios cultivos concluyeron que no se mostraba una correlación entre la morfología de los cocolitos y las concentraciones de CO₂.

La disminución del espesor y la masa con el PH sería coherente con el resultado obtenido por Meier et al. (2014) en el Mediterráneo Occidental, si bien la variación no sería tan alta como la mostrada en su estudio, y teniendo en cuenta que la desviación estándar de los valores es muy alta, lo que hace que exista gran dispersión.

Estacionalidad

El tamaño y espesor de los cocolitos de *Emiliana huxleyi* puede verse afectado por variaciones estacionales. Si representamos las medias por meses de cada uno de estos valores, (figura 6.6) se puede observar cómo los valores máximos de espesor y de tamaño se dan coincidiendo con la primavera austral.

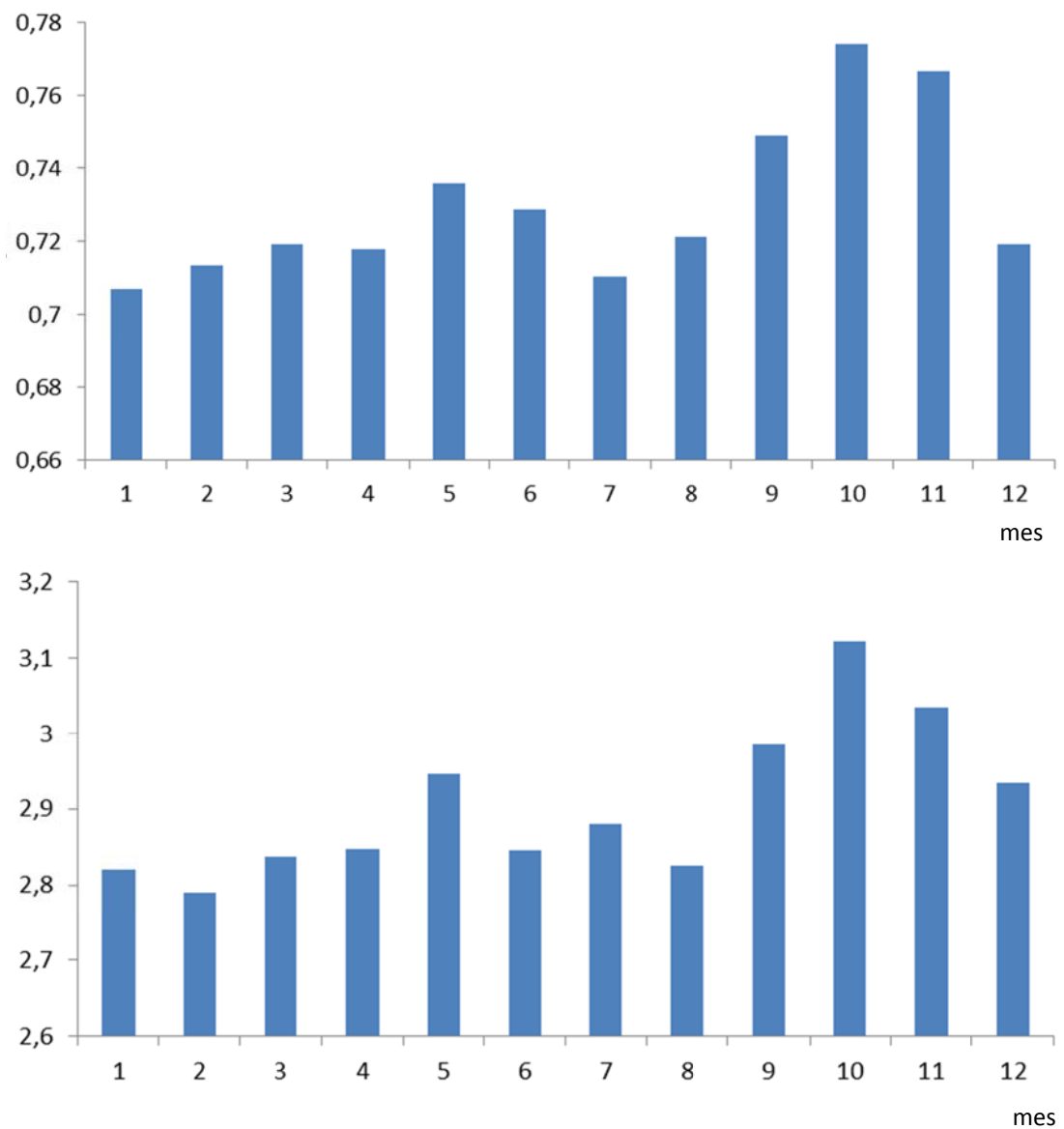


Fig. 6.6 Medias mensuales del tamaño y el espesor de los cocolitos de *Emiliana huxleyi*.

Este hecho hace que para estudiar la evolución temporal sea necesario desestacionalizar los datos, sobre todo con el fin de poder comparar medidas de varios años, ya que los periodos de cada año en los que hay datos disponibles no son los mismos para todos los años (figura 6.7), haciendo que, por ejemplo, no tenga sentido comparar directamente una media del año 2002, en los que sólo hay datos de noviembre y diciembre, con la media de 2004, en los que hay datos disponibles de casi todo el año.

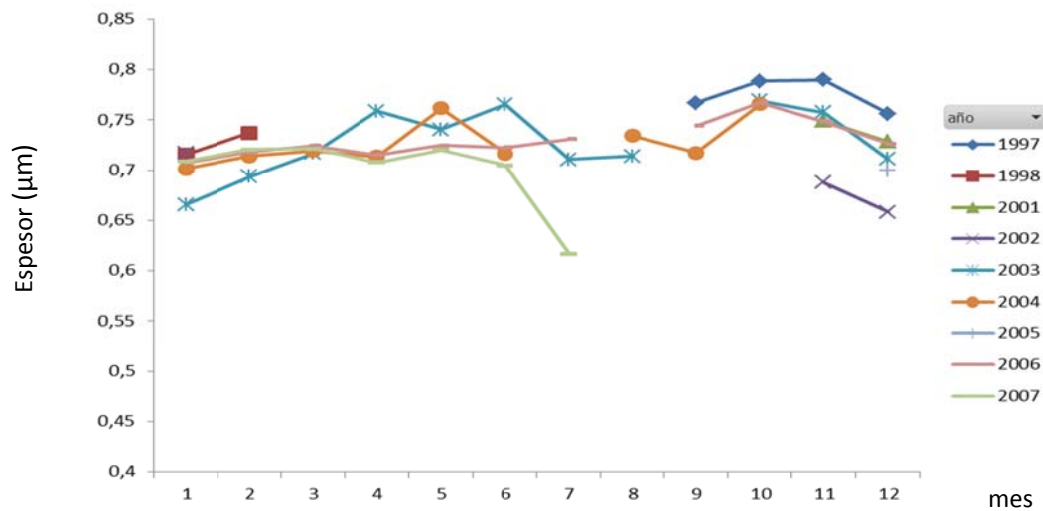


Fig. 6.7 Espesor medio mensual de los cocolitos de *E. huxleyi* (en µm), para cada mes.

Con el fin de eliminar esta estacionalidad, se ha restado a cada valor de espesor y de eje mayor las medias mensuales, de tal manera que los valores positivos se corresponderán con valores superiores a la media para ese mes y los negativos con valores menores. Los valores medidos para el PH, el espesor y el espesor menos la media mensual se muestra en la figura 6.8.

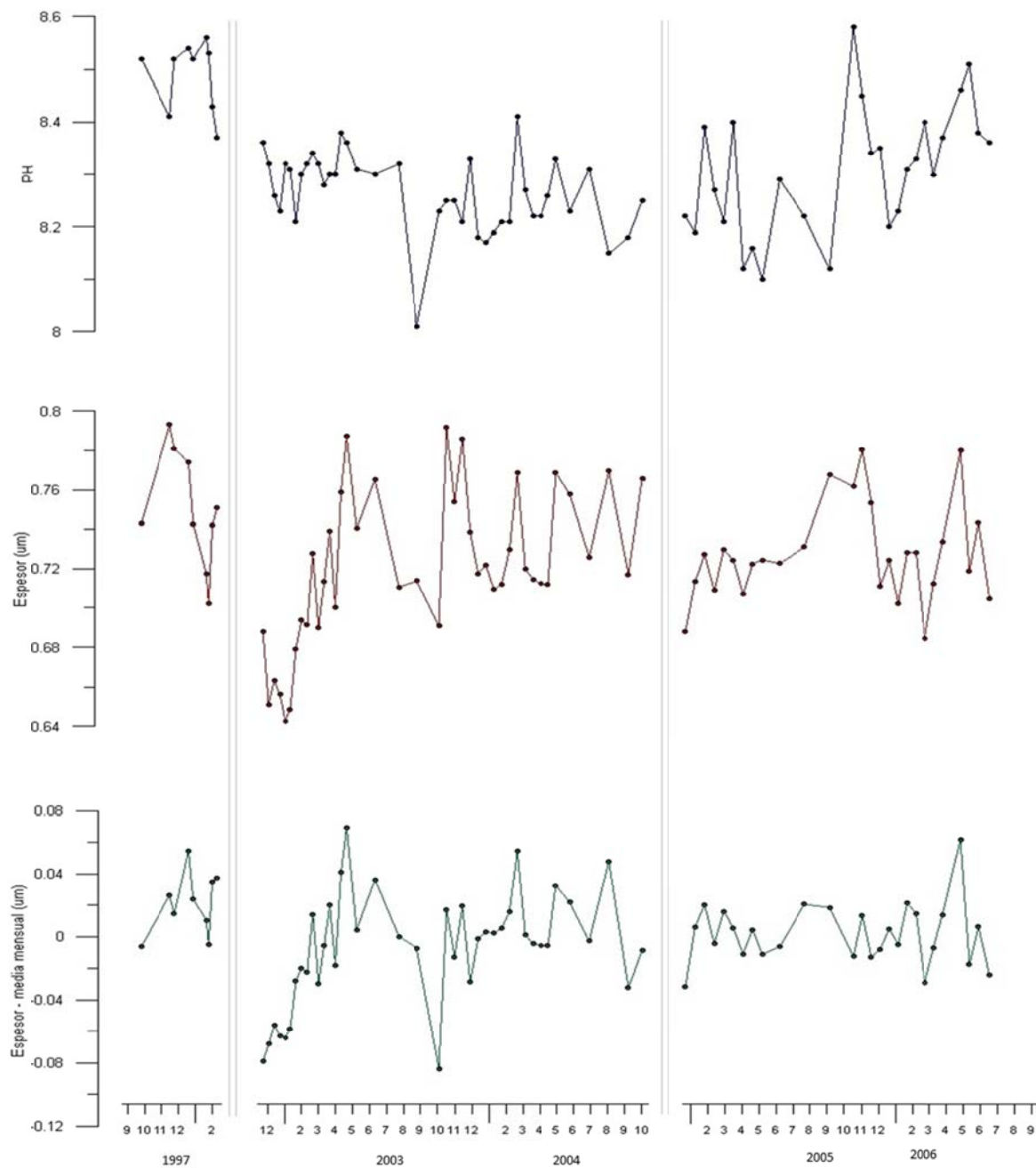


Fig. 6.8 Valores medidos para el PH, el espesor y el espesor menos la media mensual.

Diversidad de morfotipos

Sin embargo, a la hora de analizar estos resultados se debe tener en cuenta que existen varios morfotipos de *Emiliana huxleyi*, que difieren en aspectos como el tamaño o el grado de calcificación. La forma de la distribución del tamaño de los cocolitos medidos, aunque se asemeja a una gaussiana (figura 6.3), no permite extrapolar la existencia de un único morfotipo, por lo que varios podrían estar coexistiendo en las muestras medidas. Por tanto, las variaciones de parámetros como el espesor podrían ser debidas a cambios en la proporción de morfotipos presentes en la población.

Cubillos et al. (2007) estudiaron la existencia de varios morfotipos de *E. huxleyi* en el océano Austral, encontrando morfotipos B/C, A y A sobrecalcificados (figura 6.9). Patil et al., 2014 han estudiado la variabilidad morfológica de *E. huxleyi* en el sector índico del océano Austral durante el verano de 2010, encontrando cinco morfotipos, en ocasiones coincidiendo varios en la misma latitud pero a diferentes profundidades. Según su estudio, la respuesta de cada morfotipo a las condiciones ambientales sería diferente. Esta respuesta ha sido estudiada recientemente por Müller et al., 2015, a partir del cultivo de diferentes morfotipos de *E. huxleyi* cultivados a partir de muestras recogidas en el océano Austral, demostrando que la respuesta y la calcificación de cada uno de ellos es diferente.

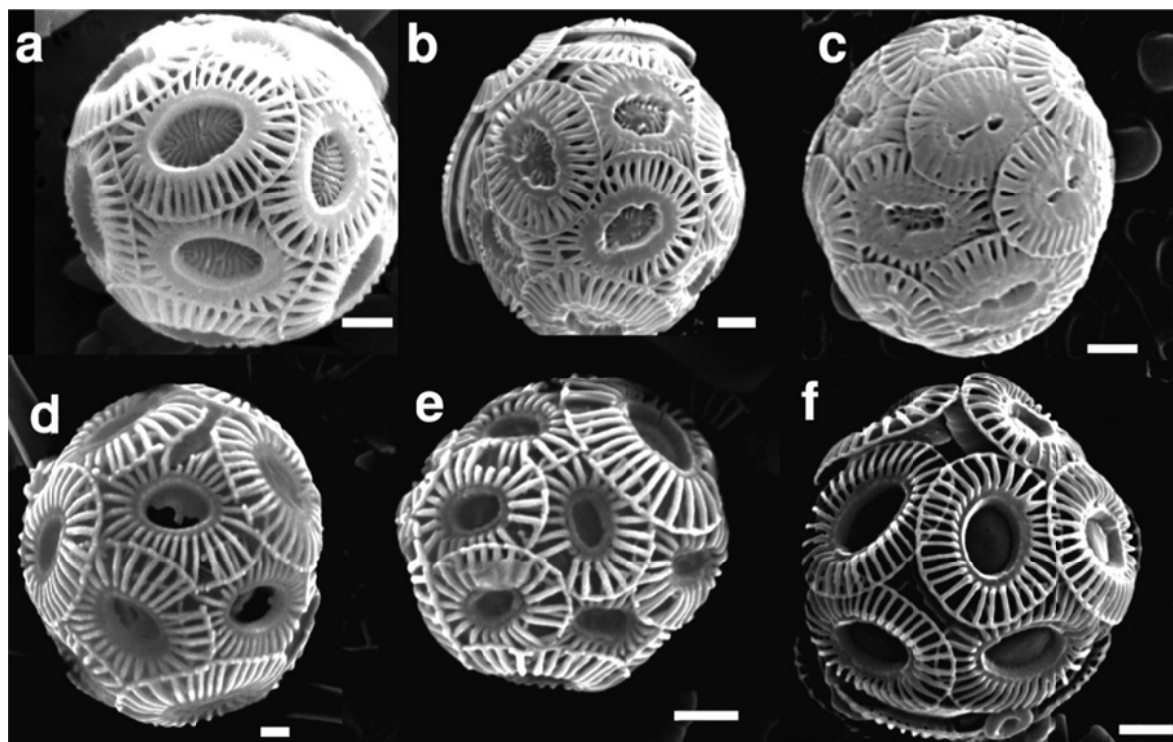


Fig. 6.9 Diferentes morfotipos de *E.huxleyi* encontrados en el océano Austral por Cubillos et al. a) Tipo A procedente de las aguas costeras Australianas, b) Tipo A procedente de 45° 28' S, 146° 93' E. c) Tipo A sobrecalcificado procedente de 47° 04' S, 146° 70' E d) Tipo B/C procedente de 51° 79' S, 142° 84' E e) Tipo B/C procedente de 55° 48' S, 140° 73' E, f) Tipo B/C procedente de 43° 74' S, 147° 36' E. Imágenes tomadas de Cubillos et al., 2007.

Por ello, no se puede descartar el hecho de que las relaciones entre las magnitudes estudiadas no se deban a variaciones en la respuesta de un determinado morfotipo de *E.huxleyi*, sino a una variación en las proporciones de cada uno de los morfotipos en la población total.

Conclusiones

El análisis de imágenes tomadas con luz polarizada circular se puede emplear para realizar mediciones morfométricas de cocolitos individuales. El área, longitud de los ejes, el volumen y el espesor pueden obtenerse de forma automática con el programa C-Calcita, obteniendo resultados coherentes que pueden interpretarse en un contexto oceanográfico.

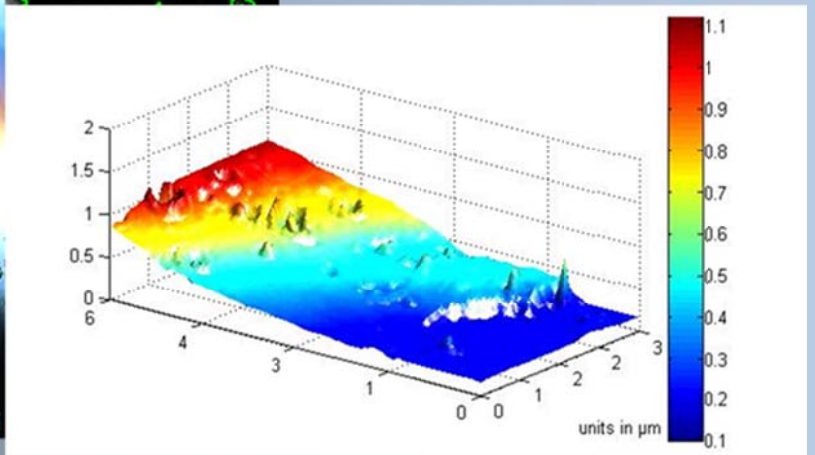
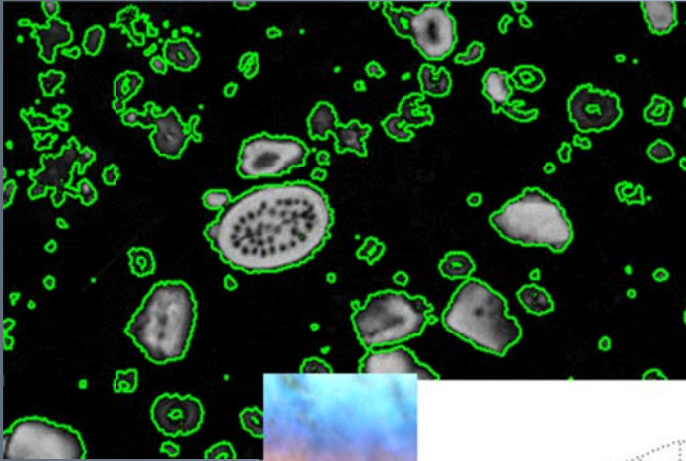
En el caso estudiado como ejemplo, se ha constatado una correlación baja aunque significativa entre el espesor de los cocolitos de *Emiliana huxleyi* y variables físico-químicas como la temperatura, el nitrato y el PH. Estos resultados están en consonancia con estudios anteriores, siendo de especial interés la correlación negativa entre el espesor y el PH, que indicaría que *E.huxleyi* responde a un entorno más ácido disminuyendo el espesor de sus cocolitos, mientras que el tamaño no se ve afectado. Sin embargo, es necesario señalar que no se puede llegar a afirmaciones categóricas, debido a la gran dispersión de los resultados, a las relativamente bajas correlaciones y a la posibilidad de que las relaciones entre magnitudes sean debidas a variaciones en las proporciones relativas de cada morfotipo presentes en la zona de muestreo.

Bibliografía

- Bach, L.T., Bauke, C., Meier, K.J.S., Riebesell, U. y Schulz, K.G., 2012. Influence of changing carbonate chemistry on morphology and weight of coccoliths formed by *Emiliana huxleyi*. *Biogeosciences*, 9, 3449–3463.
- Barcelos e Ramos, J., Muller, M.N. y Riebesell, U., 2010. Short-term response of the coccolithophore *Emiliana huxleyi* to abrupt changes in seawater carbon dioxide concentrations. *Biogeosciences*, 7, 177–186.
- Berger, C., Meier, K.J.S., Kinkel, H. y Baumann, K.H., 2014. Changes in calcification of coccoliths under stable atmospheric CO₂. *Biogeosciences*, 11, 929–944.
- Cubillos, J.C., Wright, S.W., Nash, G., de Salas, M.F., Griffiths, B., Tilbook, B.A.P. y Hallegraeff, G.M., 2007. Calcification morphotypes of the coccolithophorid *Emiliana huxleyi* in the Southern Ocean: changes in 2001 to 2006 compared to historical data. *Marine Ecology Progress Series*, 348, 47–54.
- Engel, A., Zondervan, I., Aerts, K., Beaufort, L., Benthien, A., Chou, L., Dellile, B., Gattuso, J.P., Harlay, J., Heemann, C., Hoffmann, L., Jacquet, S., Nejstgaard, J., Pizay, M.D., Rochelle-Newall, E., Schneider, U., Terbrüggen, A. y Riebesell, U., 2005. Testing the direct effect of CO₂ concentration on a bloom of the coccolithophorid *Emiliana huxleyi* in mesocosm experiments. *Limnol. Oceanogr.*, 50, 493–507.
- Fielding, S.R., Herrle, J.O., Bollmann, J., Worden, R.H. y Montagnes, D.J.S., 2009. Assessing the applicability of *Emiliana huxleyi* coccolith morphology as a sea-surface salinity proxy. *Limnol. Oceanogr.*, 54, 1475–1480.

- Flores, J.A., Colmenero-Hidalgo, E., Mejia-Molina, A.E., Baumann, K.H., Henderiks, J., Larsson, K., Prabhu, C.N., Sierro, F.J. y Rodrigues, T., 2010. Distribution of large *Emiliana huxleyi* in the Central and Northeast Atlantic as a tracer of surface ocean dynamics during the last 25,000 years. *Marine. Micropaleontology*, 76, 53–66.
- Grelaud, M., Schimmelmann, A. y Beaufort, L., 2009. Coccolithophore response to climate and surface hydrography in Santa Barbara Basin, California, AD 1917–2004. *Biogeosciences*, 6, 2025–2039.
- Horigome, M.T., Ziveri, P., Grelaud, M., Baumann, K.H., Marino, G. y Mortyn, P.G., 2014. Environmental controls on the *Emiliana huxleyi* calcite mass. *Biogeosciences*, 11, 2295-2308
- Iglesias-Rodríguez, M.D., Halloran, P.R., Rickaby, R.E.M., Hall, I.R., Colmenero-Hidalgo, E., Gittins, J.R., Green, D.R.H., Tyrrell, T., Gibbs, S.J., Dassow, P.V., Rehm, E., Armbrust, E.V. y Boessenkool, K.P., 2008. Phytoplankton calcification in a high- CO₂ world. *Science*, 320, 336-340.
- Meier, K.J.S., Beaufort, L., Heussner, S., Ziveri, P., 2014. The role of ocean acidification in *Emiliana huxleyi* coccolith thinning in the Mediterranean Sea. *Biogeosciences*, 11, 2857-2869.
- Merico, J., Tyrrell, T. y Cokacar, T., 2006. Is there any relationship between phytoplankton seasonal dynamics and the carbonate system? *Journal of Marine Systems*, 59, 120–142.
- McNeil, B.I. y Matear, R.J., 2008. Southern Ocean acidification: A tipping point at 450-ppm atmospheric CO₂. *Proceedings of the National Academy of Science*, 105.
- Müller, M.N., Beaufort, L., Bernard, O., Pedrotti, M.L., Talec, A. y Sciandra, A., 2012. Influence of CO₂ and nitrogen limitation on the coccolith volume of *Emiliana huxleyi* (Haptophyta). *Biogeosciences* , 9, 4155-4167.
- Müller, M.N., Trull, T.W. y Hallegraeff, G.M., 2015. Differing responses of three Southern Ocean *Emiliana huxleyi* ecotypes to changing seawater carbonate chemistry. *Mar. Ecol.-Prog. Ser.*, 531, 81–90.
- Orr, J.C. y otros, 2005. Anthropogenic ocean acidification over the twenty-first century and its impact on calcifying organisms. *Nature*, 437, 681–686.

- Patil, S.M., Mohan, R., Shetye, S., Gazi, S. y Jafar, S., 2014. Morphological variability of *Emiliana huxleyi* in the Indian sector of the Southern Ocean during the austral summer of 2010. *Marine Micropaleontology*, 107, 44-58.
- Riebesell, U., Zondervan, I., Rost, B., Tortell, P.D., Zeebe, R.E. y Morel, F.M.M., 2000. Reduced calcification of marine plankton in response to increased atmospheric CO₂. *Nature*, 407, 364–367.
- Smith, H.E.K., Tyrrell, T., Charalampopoulou, A., Dumousseaud, C., Legge, O.J., Birchenough, S., Petit, L.R., Garley, R., Herman, M.C., Sagoo, N., Daniels, C.J., Achterberg, E. y Hydes, D.J., 2012. Predominance of heavily calcified coccolithophores at low CaCO₃ saturation during winter in the Bay of Biscay. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 109, 8845–8849.
- Steinacher, M., Joos, F., Frolicher, T.L., Plattner, G.K. y Doney, S.C., 2009. Imminent ocean acidification in the Arctic projected with the NCAR global climate carbon cycle-climate model. *Biogeosciences*, 6, 515–533.
- Young, J. y Westbroek, P., 1991. Genotypic variation in the coccolithophorid species *Emiliana huxleyi*. *Marine Micropaleontology*, 18, 5-23.
- Winter, A. y Siesser, W.G., Eds. 2006. *Coccolithophores*. Cambridge University Press. Cambridge.
- Winter, A., Henderiks, J., Beaufort, L., Rickaby, R.E.M. y Brown, C.W., 2013. Poleward expansion of the coccolithophore *Emiliana huxleyi*. *Journal of Plankton Research*, 36, 316-325.



Capítulo VII

Conclusiones y líneas de investigación futura

Capítulo VII: Conclusiones y líneas de investigación futuras

Conclusiones

Se consideran cumplidos los objetivos que se planteaban inicialmente para la presente tesis:

1. *Establecer las ventajas del uso de luz polarizada circular para el estudio de los nanofósiles calcáreos.*

Se ha dedicado a ello el capítulo tercero: las características ópticas de la calcita, que es el mineral que forma los cocolitos y otros nanofósiles calcáreos, hacen que su observación utilizando luz circularmente polarizada presente varias ventajas frente a la luz polarizada lineal, entre las que destacan que la forma del cocolito permanece constante, independientemente del ángulo de la platina de microscopio, desapareciendo las típicas zonas de extinción de los cocolitos con forma elíptica o circular, y las variaciones de intensidad luminosa de pequeños nanolitos como los de *Florisphaera profunda*, que pueden hacer que lleguen a desaparecer del campo de visión en ciertos ángulos.

Se ha demostrado también como la visibilidad de nanolitos que tienen su eje óptico paralelo al eje óptico del microscopio, o las unidades tipo V de heterococolitos como los de *Coccolithus pelagicus* dependen de la iluminación oblicua conseguida con el condensador del microscopio.

2. *Explicar cómo un microscopio óptico con polarización lineal puede modificarse para utilizar luz polarizada circular.*

En el capítulo segundo se describe cómo un microscopio preparado para trabajar con luz polarizada lineal se puede adaptar fácilmente para usar luz polarizada circular colocando dos láminas $\lambda/4$ después del primer polarizador lineal y antes del segundo polarizador lineal, ambas orientadas a 45° respecto al eje de los polarizadores.

3. *Elaborar un programa informático que permita realizar medidas cuantitativas de variables morfométricas y, en especial, del volumen y el espesor de cocolitos individuales, a partir de imágenes fotográficas capturadas con un microscopio equipado con polarización circular.*

En el segundo capítulo describe el programa desarrollado, bautizado como C-Calcita, con el que es posible realizar mediciones biométricas de cocolitos, destacando la posibilidad de calcular el volumen de cocolitos individuales, midiendo su área y su espesor.

El ejecutable del programa C-Calcita se incluye como anexo de la presente tesis en un CD-ROM adjunto.

4. *Realizar medidas con muestras reales que pongan de manifiesto las ventajas del uso de luz polarizada circular. En concreto:*

- *Medición de cocolitos individuales.*

En el capítulo cuarto la técnica se ha aplicado al estudio de cocolitos individuales de diversas especies, comparando los resultados con técnicas previas, destacando las

ventajas del uso de luz polarizada circular frente a ellas y, en el sexto capítulo se ha realizado un estudio más exhaustivo de los cocolitos de *Emiliania huxleyi* presentes en muestras de sedimentos recogidas en trampas situadas en la Zona del Frente Polar del océano Austral. Los resultados obtenidos muestran la utilidad de la técnica y cómo se puede utilizar para realizar estudios oceanográficos.

- Cálculo de flujo de calcita debido a cocolitos.

El cálculo de flujo de calcita debido a cocolitos es otra de las principales aplicaciones de la técnica. Por ello, en el capítulo quinto se han realizado mediciones de esta variable en muestras de sedimentos recogidas en trampas situadas en la Zona del Frente Polar del océano Austral, interpretando y comparando los resultados con los obtenidos con otras técnicas y destacando las ventajas de esta nueva metodología frente a otras anteriores.

Como conclusión general, se debe destacar el hecho de que un microscopio óptico que utilice luz polarizada lineal se puede modificar fácilmente para que utilice luz polarizada circular. Al observarlos con este tipo de luz, los cocolitos muestran una forma constante, independientemente de su ángulo respecto a la platina del microscopio, lo que facilita la realización de medidas biométricas y, en especial, posibilita calcular su espesor y volumen. Además, si la muestra ha sido preparada por decantación, obteniendo una distribución uniforme, es posible estimar el flujo de calcita debido únicamente a cocolitos presente en una muestra.

La técnica permite obtener resultados coherentes, tanto de masa y volumen de cocolitos individuales como de flujo de calcita debido a cocolitos. El análisis de los resultados obtenidos puede ser utilizado para el estudio de cuestiones de gran trascendencia, como son la contribución de los cocolitos al ciclo del carbono o la respuesta de los cocolitóforos a condiciones de PH variables. Este hecho se ha puesto de manifiesto en los ejemplos estudiados en los capítulos IV, V y VI, y en la reciente publicación:

Bolton, C.T., Hernández-Sánchez, M.T, **Fuertes, M.A.**, González-Lemos, S.,
Abrevaya, L., Mendez-Vicente, A., Flores, J.A., Probert, I., Giosan, L.,

Johnson, J. y Stoll, H.M., 2016. Decrease in coccolithophore calcification and CO₂ since the middle Miocene. Nature Communications, 7, article number 10284. doi:10.1038/ncomms10284

Este artículo ha sido incluido como anexo en la presente tesis.

Conclusions

The use of circularly polarized light has been proposed for the study of calcareous nanofossils. As described on the second chapter, a crossed polarizer microscope can be adapted to give circularly polarized illumination by using two $\lambda/4$ plates, one placed above the polarizer and the other below the analyzer.

When observed with circularly polarized light, coccoliths do not show extinction patterns, and so remain the same shape independent of the angle of the stage, which has a number of important applications in biometry, identification and calculation of the amount of calcite produced by coccolithophores. The visibility of nannoliths such as *Discoaster* or of the V-units of the heterococcoliths such as *C. pelagicus* does not depend of the use of linearly or circularly polarized light, but on the oblique illumination given by the condenser. These facts are detailed on chapter three.

A computer program called 'C-Calcita' has been developed using Matlab, in order to get quantitative measurements from coccoliths images taken using circular polarized light. The program has been described on the second chapter and the results obtained for individual coccoliths of several taxa are presented on chapters four and six. The mass estimates obtained using the circular polarization/gray level method and the program C-Calcita, are similar to those obtained in previous studies using other techniques, and they can be used for oceanographic studies.

The coccolith calcite flux can also be measured from images taken under circularly polarized light, if the samples are prepared obtaining a homogeneous distribution. This is described on chapter five.

Líneas de investigación futuras

Como líneas de investigación futura se propone extender la calibración para poder medir espesores de cocolitos superiores a $1,55 \mu\text{m}$, que al observarlos con luz polarizada generan imágenes de colores, más allá de la región de grises. En este aspecto ya se está trabajando en colaboración con Heather Stoll y Saúl González de la Universidad de Oviedo, utilizando para ello una cuña de calcita tallada con un ángulo determinado, de tal manera que su espesor en cada punto es conocido y una imagen suya puede ser utilizada para calibrar los distintos colores y tonalidades (figura 7.1).

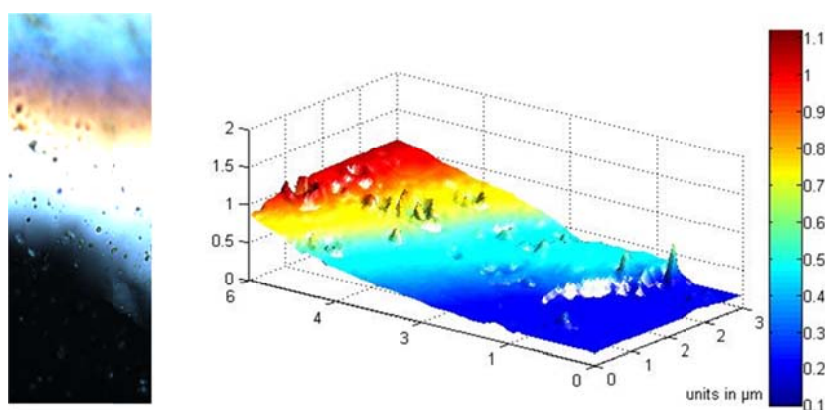


Fig. 7.1 Cuña de calcita y perfil transversal obtenido con el programa C-Calcita.

Otra de las ventajas de la utilización de polarización circular es su uso para programar sistemas de reconocimiento y conteo automático de cocolitos. La técnica puede suponer una gran mejora en este campo al presentar grandes ventajas frente al uso de luz polarizada lineal,

como son el hecho de que la forma de los cocolitos sea independiente de su ángulo respecto a la platina, que todos los cocolitos sean visibles en una única imagen de un campo visual y, que no tengan zonas oscuras que dificulten la identificación de cada cocolito como una entidad única. Por ello se propone como línea de investigación futura la mejora de los sistemas de reconocimiento y conteo automáticos a partir de imágenes tomadas utilizando luz polarizada circular.

En este sentido se ha comenzado a desarrollar un programa utilizando Matlab, aún en fase de pruebas y desarrollo, que identifica y clasifica los cocolitos presentes en una imagen, tras aislarlos y recortarlos mediante diversos algoritmos de detección de bordes y, posteriormente, los identifica al compararlos con diversas imágenes utilizadas como patrón y que han sido cargadas previamente en el programa. Aunque se trata de resultados preliminares, se ha constatado que si las imágenes que se utilizan han sido tomadas con luz polarizada circular, los cocolitos son aislados e identificados más fácilmente que si se emplea luz polarizada linealmente.

Índice de figuras

Fig. 1.1	Estructura de una célula cocolitófora. Modificado de Young y Henriksen (2003).....	29
Fig. 1.2	Ciclo de vida de los cocolitóforos.	31
Fig. 1.3	Tipos de heterococolitos y nomenclatura empleada. Adaptada y modificada de http://ina.tmsoc.org/terminology/3coccoliths.htm	33
Fig. 1.4	Diferentes holococolitos. La fotografía de la derecha muestra una cocosfea con holococolitos y heterococolitos.	34
Fig. 1.5	Tipos de nanolitos.....	34
Fig. 1.6	Diferentes morfotipos de <i>Emiliana huxleyi</i> . Modificado de Young et al., 2003	35
Fig. 1.7	Estructura atómica de un cristal de calcita.....	37
Fig. 1.8	Orientación del eje óptico (línea roja) en las unidades cristalinas tipo R y V. Modificado de Young y Henriksen (2003).	39
Fig. 1.9	Crecimiento del cocolito a partir del anillo protococólítico, con la unidades cristalina tipo R (blancas) y V (grises). Modificado de Young y Henriksen (2003).....	40
Fig. 1.10	Dirección de oscilación de los campos eléctrico (E) y magnético (B) comparados con la dirección de propagación de la luz.....	45
Fig. 1.11	Se muestra un haz de luz (azul) inicialmente polarizado linealmente que incide en un material birrefringente (paralelepípedo naranja). A medida que recorre el material, las componentes perpendiculares en las que se puede descomponer el campo eléctrico (verde y roja) se van desfasando, de tal manera que cuando abandona el material la luz está polarizada circularmente. Simulación realizada con el programa EMANIM.....	47

Fig. 1.12	Indicatriz óptica. Los ejes de la elipse representan los índices de refracción ordinario y extraordinario.....	48
Fig. 1.13	Factores que influyen en la diferencia de fase entre el rayo ordinario y el extraordinario en el caso general. Figura modificada de Shribak y Olderbourg, 2002.	51
Fig. 2.1	Principales elementos de un microscopio polarizador (lineal).....	59
Fig. 2.2	Tablas mostrando los distintos colores de interferencia en función del espesor y de la diferencia de índices de refracción del material analizado, publicadas por Michel-Levy en 1888 (superior) y por Sørensen en 2012 (inferior).	61
Fig. 2.3	Principales elementos de un microscopio polarizador (circular)	63
Fig. 2.4	Equipo empleado.....	64
Fig. 2.5	Aspecto general del programa C-Calcita.....	66
Fig. 2.6	Imágenes del micrómetro utilizadas para realizar la calibración horizontal y vertical.	68
Fig. 2.7	Medición de la anchura y del nivel de gris en el punto medio de una Rhabdosphaera. Como su sección es circular, su ancho en el punto central (señalado por la flecha roja) se corresponderá con el espesor.	70
Fig. 2.8	Relación entre el nivel de gris capturado por una cámara de 14 bits de profundidad de color y el espesor de un cristal de calcita. Modificado de Beaufort (2015).....	70
Fig. 2.9	Pantalla del programa C-Calcita que permite la introducción de los valores anchura/espesor y nivel de gris para realizar su ajuste a una función del tipo arcoseno. El valor calculado debe introducirse en la casilla indicada de la ventana principal del programa.....	72
Fig. 2.10	a) Calibración del espesor utilizando una espícula calcárea (imagen superior), representación tridimensional de una sección de dicha espícula tras la calibración (centro) y b) diferencia entre los valores medidos y los calculados utilizando una calibración lineal o una con la función arcoseno.	73
Fig. 2.11	Diferencias entre una calibración con una cámara de 255 niveles de gris en la que la saturación se hace coincidir con un espesor de 1,55 μm (derecha) o con un espesor menor (izquierda). En la fila inferior se muestra la relación visual entre el espesor y el nivel de gris, y en la fila superior se muestra cómo se verían partículas de diferentes espesores. En el caso de que la saturación sea a 1,55 μm , si sólo se desea observar partículas de espesores sensiblemente menores, la resolución obtenida es menor, al no aprovechar todos los niveles de gris disponibles.....	74
Fig. 2.12	Imagen de un cocolito de <i>Coccolithus pelagicus</i> tomada con luz polarizada circular, perfil y representación 3D. En la esquina superior derecha se	

	muestra la estimación del perfil y el espesor para un cocolito similar publicada por Young and Ziveri (2000).....	76
Fig. 2.13	Estimación del volumen de un cocolito a partir de su nivel de gris. En la fila superior se muestra un escudo proximal aislado de <i>Calcidiscus</i> y en la fila superior se muestra un cocolito completo, observado con luz polarizada lineal (A y A'), circular (B y B') y representación 3D realizada en C-Calcita (C y C').	77
Fig. 2.14	Estimación de la cantidad de carbonato debido a cocolitos en un área en la que aparecen fragmentos de cocolitos.	79
Fig. 3.1	Trayectoria de un rayo de luz desviado por el condensador.....	90
Fig. 3.2	Comparación entre imágenes de <i>Calcidiscus leptoporus</i> (Columna A), <i>Coccolithus pelagicus</i> (Columna B) y <i>Discoaster</i> (Columna C) tomadas con diferentes configuraciones del microscopio: En la primera fila se muestra iluminadas en campo claro, sin utilizar polarizadores. En la segunda fila se muestran iluminadas con luz polarizada circular con condensador, y en la tercera fila se muestran iluminadas con luz polarizada circular pero eliminando el efecto del condensador. En la última fila se muestran iluminadas con luz polarizada lineal y con condensador. Nótese cómo, en la segunda fila, las unidades V de <i>C. leptoporus</i> y <i>C. pelagicus</i> , y el <i>Discoaster</i> completo se muestran oscuros al ser iluminados con luz paralela al eje óptico.	91
Fig. 3.3	El mismo campo visual observado con luz polarizada lineal (fila superior) y con luz polarizada circular (fila inferior), con la platina rotada a 0°, 15°, 30° y 45° (Columnas primera a cuarta respectivamente). Cuando se utiliza luz polarizada lineal el nanolito de <i>Florisphaera profunda</i> , señalado inicialmente con una flecha, va variando su intensidad hasta llegar a ser indetectable cuando el ángulo es de 45°. Sin embargo si se utiliza luz polarizada circular su brillo permanece constante independientemente del ángulo.....	93
Fig. 3.4	Pequeño cocolito de <i>Gephyrocapsa</i> . La longitud, ancho y ángulo del puente pueden ser medidas de una forma más precisa si se utiliza luz polarizada circular (derecha) en lugar de lineal (izquierda).....	94
Fig. 3.5	Comparación de imágenes del mismo campo visual tomadas con polarización lineal (izquierda) y circular (derecha). En la fila inferior se muestra la detección automática de bordes basada en un valor umbral de gris.	94
Fig. 3.6	Comparación de imágenes de cocolitos tomadas con luz polarizada lineal (A – I) y circular (A' – I') .): A) small <i>Gephyrocapsa</i> , B) <i>Emiliania huxleyi</i> , C) <i>Syracosphaera</i> spp., D) <i>Calcidiscus leptoporus</i> , E) <i>Helicosphaera carteri</i> , F) <i>Pontosphaera discopora</i> , G) <i>Pontosphaera multipora</i> , H) <i>Coccolithus pelagicus</i> , I) <i>Braarudosphaera bigelowii</i>	95
Fig. 3.7	Comparación de imágenes del mismo campo visual tomadas con polarización lineal (superior) y circular (inferior).....	96

Fig. 3.7	(continuación) Comparación de imágenes del mismo campo visual tomadas con polarización lineal (superior) y circular (inferior).....	97
Fig. 3.7	(continuación) Comparación de imágenes del mismo campo visual tomadas con polarización lineal (superior) y circular (inferior).....	98
Fig. 3.7	(continuación) Comparación de imágenes del mismo campo visual tomadas con polarización lineal (superior) y circular (inferior).....	99
Fig. 4.1	Localización del testigo MD 99-2343 del que proceden las muestras analizadas.....	109
Fig. 4.2	Calibración del nivel de gris y el espesor correspondiente utilizando la imagen de una <i>Rhabdosphaera</i> . El ancho se puede medir directamente sobre la imagen, previamente calibrada, y el nivel de gris medido en el punto medio (A). Se realiza un ajuste entre el nivel de gris y el espesor (B). El volumen obtenido y el perfil (C) y (D) se corresponden con los de un cilindro, en los que su sección es circular.	111
Fig. 4.3	Eje mayor de diferentes especies de cocolitos frente a su masa medida. El gráfico es similar al de una función cúbica del tipo $y = a x^3$	115
Fig. 4.4	Comparación entre la masa medida y de la estimada con la metodología de Young y Ziveri para el caso de <i>Helicosphaera carteri</i>	117
Fig. 4.5	Ajuste a una función cúbica (línea azul) de los valores medidos para los cocolitos de <i>Helicosphaera carteri</i>	117
Fig. 4.6	Comparación de los resultados obtenidos con los publicados por Bollmann (2014) para algunas especies representativas.....	118
Fig. 5.1	Influencia de las aguas profundas formadas en el océano Antártico en la circulación termohalina global. Figura tomada de Siedler et al., 2013.	129
Fig. 5.2	Masas de agua y circulación en el océano Austral. Modificada de Tomzack, y Godfrey, 2003.	130
Fig. 5.3	Superior: localización de la trampa de sedimentos en relación con las distintas zonas polares: (STF - Subtropical Front, SAF - Subantarctic Front, PF – Polar Front, SB - Southern Boundary), regiones (STZ – Subtropical Zone, SAZ – Subantarctic Zone, PFZ – Polar Front Zone, ACC – Antarctic Zone y SACCZ - Zona sur del ACC) y extensión máxima del hielo en invierno (MaxWSI). Inferior: Batimetría, situación de las trampas y principales masas de agua SAMW – Subantarctic Mode Water, AAIW – Antarctic Intermediate Water, UCDW – Upper Circumpolar DeepWater, LCDW– Lower Circumpolar Deep Water and AABW – Antarctic Bottom Water. Figura adaptada de Rigual-Hernández et al. (2015).	132
Fig. 5.4	Trampa de sedimentos McLane Parflux similar a la utilizada. Fotografía cortesía de Andrés Rigual.	134

Fig. 5.5	Proceso de preparación de las muestras. Modificado de Flores y Sierro (1997).	136
Fig. 5.6	Flujo de carbonato debido a cocolitos (azul) comparado con el contenido total de carbonato analizado en el laboratorio (rojo) para todas las muestras.	141
Fig. 5.7.a	Asociaciones de cocolitofóridos y flujo de cocolitos a 800 metros de profundidad. Nótese la escala logarítmica.	145
Fig. 5.7.b	Asociaciones de cocolitofóridos y flujo de cocolitos a 1500 metros de profundidad. Nótese la escala logarítmica.	146
Fig. 5.8.a	Comparación entre el contenido total de CaCO_3 y el carbonato debido a cocolitos estimado por dos metodologías diferentes para la trampa de 800 m. Se muestra también el contenido total de carbonato.	147
Fig. 5.8.b	Comparación entre el contenido total de CaCO_3 y el carbonato debido a cocolitos estimado por dos metodologías diferentes para la trampa de 1500 m. Se muestra también el contenido total de carbonato.	148
Fig. 5.9	Contribución mensual de los cocolitos al flujo total de carbonato.	151
Fig. 5.10.a	Flujo de carbonato debido a cocolitos medido a distintas profundidades a lo largo del periodo 4 de octubre de 2003 hasta el 3 de Abril de 2004.	152
Fig. 5.10.b	Flujo de carbonato debido a cocolitos medido a distintas profundidades a lo largo del periodo el 18 de octubre de 2006 hasta el 11 de julio de 2007.	153
Fig. 5.11	Espectro de absorción de <i>G. oceánica</i> y <i>E. huxleyi</i> , extraído de Sadegui et al., 2012.	154
Fig. 5.12	Comparación del flujo de carbonato debido a cocolitos medido con el nitrato, la temperatura superficial (SST), la clorofila-a y la radiación PAR.	155
Fig. 5.13	Comparación del flujo de carbonato debido a cocolitos con la concentración de nitrato.	156
Fig. 5.14	Comparación del flujo de carbonato debido a cocolitos con la concentración de clorofila-a.	157
Fig. 5.15	Comparación del flujo de carbonato debido a cocolitos con la concentración de clorofila-a y con la radiación fotosintética PAR.	158
Fig. 5.16	Comparación entre el flujo debido a cocolitos medido (zona sombreada) con la radiación PAR y con la temperatura superficial.	159
Fig. 5.17	Comparación entre el flujo de carbonato debido a cocolitos y el flujo de valvas de diatomeas (Rigual et al., 2015)	160
Fig. 5.18	Comparación entre el flujo debido a cocolitos medido (zona sombreada) con el nitrato, el flujo de diatomeas, la radiación PAR y la clorofila-a.	161
Fig. 5.19	Profundidad de la capa de mezcla, a partir de las estimaciones de Boyer Montégut et al. 2004 y 2007.	162

Fig. 5.20	Perfiles verticales de temperatura, nitrato, fosfato y saturación de oxígeno a distintas profundidades. Valores extraídos del World Ocean Atlas 2009.	162
Fig. 6.1	Variación del espesor, masa y longitud de los cocolitos de <i>Emiliana huxleyi</i> a lo largo del tiempo.....	179
Fig. 6.2	Gráfico de cajas de las mediciones de espesor de los cocolitos de <i>Emiliana huxleyi</i>	180
Fig. 6.3	Distribuciones de las medidas de longitud, masa y espesor de los cocolitos medidos.	181
Fig. 6.4	Relación entre la masa y la longitud (izquierda) y entre el espesor y la longitud (derecha) de los cocolitos medidos.	183
Fig. 6.5	Variación del espesor con el PH y línea de tendencia.	185
Fig. 6.6	Medias mensuales del tamaño y el espesor de los cocolitos de <i>Emiliana huxleyi</i>	187
Fig. 6.7	Espesor medio mensual de los cocolitos de <i>E. huxleyi</i> (en μm), para cada mes.	188
Fig. 6.8	Valores medidos para el PH, el espesor y el espesor menos la media mensual.	189
Fig. 6.9	Diferentes morfotipos de <i>E.huxleyi</i> encontrados en el océano Austral por Cubillos et al. a) Tipo A procedente de las aguas costeras Australianas, b) Tipo A procedente de 45° 28' S, 146° 93' E. c) Tipo A sobrecalcificado procedente de 47° 04' S, 146° 70' E d) Tipo B/C procedente de 51° 79' S, 142° 84' E e) Tipo B/C procedente de 55° 48' S, 140° 73' E, f) Tipo B/C procedente de 43° 74' S, 147° 36' E. Imágenes tomadas de Cubillos et al., 2007.	191
Fig. 7.1	Cuña de calcita y perfil transversal obtenido con el programa C-Calcita.	204

Agradecimientos

En primer lugar, debo dar las gracias a Abel, Paco y a Lines, por hacer realidad el Grupo de Geociencias Oceánicas, y en especial a Abel, por todo el tiempo dedicado y por dejar la puerta de su despacho abierta.

A José Ignacio, quien en otra época habría podido pasar las horas en un scriptorium, embelleciendo con pan de oro los dibujos de un beato, y con el mismo mimo, delicadeza y buen hacer prepara las muestras. Él y Rocío hacen que el laboratorio sea un lugar donde sentirse acogido.

A todas las personas que durante estos años han ido pasando por el grupo: Iván, Mariem, Elena, Eloy, Margarita, Montse, Deborah, Andrés, Mieke, Alejandra... a los que siguen allí, (aunque alguna ya esté haciendo las maletas): Blanca, Gloria, Marta, Ana ... y también a los que han colaborado, con su trabajo y sus consejos: Saúl, Mario (obrigado), Clara y Heather (thank you).

Y a mi madre, por apoyarme aunque no sepa muy bien de qué va todo esto.

Anexos

Como anexos a la presente tesis se incluyen:

- I. Artículo publicado en la revista Marine Micropaleontology en el que se describe la técnica y se presentan los datos que aparecen en el capítulo V de la presente tesis:

Fuertes, M.A., Flores, J.-A., Sierro, F.J. 2014, The use of circularly polarized light for biometry, identification and estimation of mass of coccoliths. Marine Micropaleontology, 113 pp. 44–55. DOI:10.1016/j.marmicro.2014.08.007

- II. Artículo publicado en la revista Nature Communications en el que gran parte de los datos utilizados para su elaboración han sido obtenidos utilizando el programa C-Calcita:

Bolton, C.T., Hernández-Sánchez, M.T, **Fuertes, M.A.**, González-Lemos, S., Abrevaya, L., Mendez-Vicente, A., Flores, J.A., Probert, I., Giosan, L., Johnson, J. y Stoll, H.M., 2016. Decrease in coccolithophore calcification and CO₂ since the middle Miocene. Nature Communications, 7, article number 10284. DOI:10.1038/ncomms10284

- III. Registro de propiedad intelectual del programa C-nanopattern, que contiene parte del código integrado en el programa C-Calcita que se describe en el capítulo IV.
- IV. CD-ROM con el ejecutable del programa C-Calcita y las mediciones utilizadas para la elaboración de los capítulos IV, V y VI.

I. Artículo publicado en la revista Marine Micropaleontology

Fuertes, M.A., Flores, J.-A., Sierro, F.J. 2014, The use of circularly polarized light for biometry, identification and estimation of mass of coccoliths. *Marine Micropaleontology*, 113 pp. 44–55



Research paper

The use of circularly polarized light for biometry, identification and estimation of mass of coccoliths



Miguel-Ángel Fuertes*, José-Abel Flores, Francisco J. Sierra

Grupo de Geociencias Oceánicas, Geology Department, University of Salamanca, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 1 August 2013

Received in revised form 27 August 2014

Accepted 30 August 2014

Available online 16 September 2014

Keywords:

Polarizing microscopy
Circularly polarized light
Coccolith mass
Biometry
Identification
Calcite

ABSTRACT

The most commonly used tool for observing and identifying coccoliths and other calcareous nanofossils is a transmitted light microscope equipped with crossed polarizers. Such microscopes can readily be modified to produce circularly polarized light (CPL) instead of linearly polarized light, and this can overcome some disadvantages of linearly polarized light. With circularly polarized light there is no extinction of small coccoliths at any orientation, so the whole specimen can be seen at once and radial coccoliths no longer show the pseudo-extinction crosses typical of crossed polarized light, so their appearance does not vary with orientation and some aspects of their morphology are much easier to observe. Finally the combination of circularly polarized light and the oblique illumination obtained with the microscope condenser means that coccolith brightness is less dependent on inclination of the crystal c-axis than is generally assumed and so that mass estimates based on integrated brightness are more reliable than might be expected. This illumination method thus has a wide range of applications in the study of calcareous nanofossils, including biometry, taxonomic identification, and calculations of coccolith size and mass for a wide range of taxa. Here we describe this method combined with the development of a new computer program for analysis of images captured under circularly polarized light. We then focus on applying this technique to calculations of coccolith size and mass of various taxa, comparing results with previous studies.

© 2014 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Coccolithophore algae possess small calcareous plates called coccoliths that they secrete to form a cell covering. Calcium carbonate (CaCO_3) has three anhydrous crystalline polymorphs: vaterite, aragonite, and calcite. Traces of aragonite and vaterite precipitated with calcite have been reported in modern coccoliths (i.e., Wilbur and Watabe, 1963), however these findings have not been corroborated (Young et al., 1991) and neither aragonite nor vaterite have been found in nanofossil sediments because they are unstable minerals that revert to calcite. Therefore, fossil coccoliths are composed of calcite. The most common method for observing and identifying calcareous nanofossils is using a transmitted light microscope equipped with crossed polarizers (also called crossed nicols). The sample is illuminated with linearly polarized light and observed through a second linear polarizer, usually called the analyzer, orientated at 90° to the first polarizer. Isotropic materials appear dark, as do anisotropic materials viewed along an optical axis. Other anisotropic materials show interference colors depending on their shape, thickness and orientation.

Since Kamptner (1954) demonstrated that coccoliths of different taxa show different extinction patterns, taxonomic identification has

routinely made use of diagnostic extinction patterns. However, this traditional technique, using linearly polarized light, has some disadvantages. For example, when observed with linearly polarized light, coccoliths with a radial fabric and circular or elliptical shape show distinct extinction crosses, with some areas where the extinction of light is total, so they appear black, and others where brightness is at a maximum. Although these extinction crosses can be useful for identifying taxa, they can also be a disadvantage for some applications because the brightness depends not only on the thickness and shape, but also on the orientation of the coccolith with respect to the axes of the polarizers. Furthermore, for specimens formed of single crystal units, such as *Florisphaera profunda* nanoliths, the whole specimen is invisible at some angles, which means that the observer has to rotate the microscope stage in order to see them. These disadvantages can be overcome if circularly polarized light is used instead of linearly polarized light. Furthermore, a method of estimating the mass of a single coccolith originally proposed by Beaufort (2005) using images taken with linearly polarized light can be improved if circularly polarized light is used.

Although circular polarization is not a new technique and indeed is commonly used in several fields of science, it has not yet been widely applied to the study of coccoliths and has the potential to become an important technique in the field, as demonstrated recently by Fuertes et al. (2013) and Bollmann (2014). Here, we describe this technique in detail and present a new computer program for coccolith size

* Corresponding author.

E-mail address: fuertes@usal.es (M.-Á. Fuertes).

and mass determination using images captured under circularly polarized light, and then apply this method to some common Pleistocene coccolithophore taxa.

2. Materials and methods

In this study we used a Nikon Eclipse LV100 POL polarized light microscope with a 100× H/N2 objective, two $\lambda/4$ plates and a Nikon DS-Fi1 Digital Camera. The images were captured using Nis-Elements software, and processed with a customized program developed in MatLab, named C-Calcita. The sample slides were prepared using the decantation method of Flores and Sierro (1997), which creates a homogenous distribution and therefore allows calculations of the number of coccoliths per gram of sediment and coccolith fluxes to be made.

2.1. Description of the microscope technique

When a linear polarizer microscope is used, the light ray that passes through a birefringent material is split into two perpendicular rays, the ordinary and the extraordinary, that are propagated through the sample with different velocities. The retardation of the slow ray with respect to the fast one means that when both rays emerge from the sample they have a phase difference (φ) that depends on the difference in the refractive index of the two rays (n_o and n_e), the thickness of the sample (d), and the wavelength of the light (λ), such that:

$$\varphi = 2 \pi d(n_e - n_o) / \lambda.$$

The ordinary and extraordinary rays are recombined when they pass through the second polarizer, where they interfere. The interference image obtained depends on the phase difference between the two rays. As calcite is a highly birefringent material, coccoliths can easily

be seen in linearly polarized light and they show an extinction pattern when viewed through the crossed nicols of a polarizing microscope.

A linear polarizer microscope can be transformed into a circular polarizer microscope by using two $\lambda/4$ retardation plates (Fig. 1a), placing one of them above the lower linear polarizer at an angle of 45° relative to it and the other one before the upper linear polarizer, also at 45°.

Linearly polarized light can be described as two orthogonal components, E_x and E_y , which are equal and in phase. When light falls on the $\lambda/4$ plate with an angle of 45° relative to its optical axis, the components travel along it with different velocities, so that when they exit the plate they maintain the same angle but have a 90° phase shift: when one of them is maximal, the other is minimal. This means that light emerging from the plate is circularly polarized (e.g., Saleh and Teich, 1991; Hecht, 2002; Bass, 2009).

The circularly polarized light then falls on the sample. When a ray of light falls on a birefringent material such as calcite, it is split into two rays, as described above. When rays of light fall perpendicular to the optical axis, as is the case in the R units of heterococcoliths (Young et al., 1992; Young and Henriksen, 2003) or in nannoliths like *F. profunda* (Kameo and Furukawa, 2007), the trajectories of the ordinary and extraordinary rays are the same, but they travel along the crystal with different velocities, and when they emerge they have a phase shift. In the specific case when the incident rays are parallel to the optic axis, they are not split into two rays and the calcite behaves as if it were optically isotropic (e.g., Murphy, 2001).

When circularly polarized light passes through the calcite element and is split into two components, both components travel with the same angular velocity: the phase shift remains constant and the emerging light remains circularly polarized. Subsequently, the light passes through a second $\lambda/4$ plate which turns the circularly polarized light linear again, so it can be analyzed by the upper linear polarizer, producing an image where only the birefringent materials are seen and with no

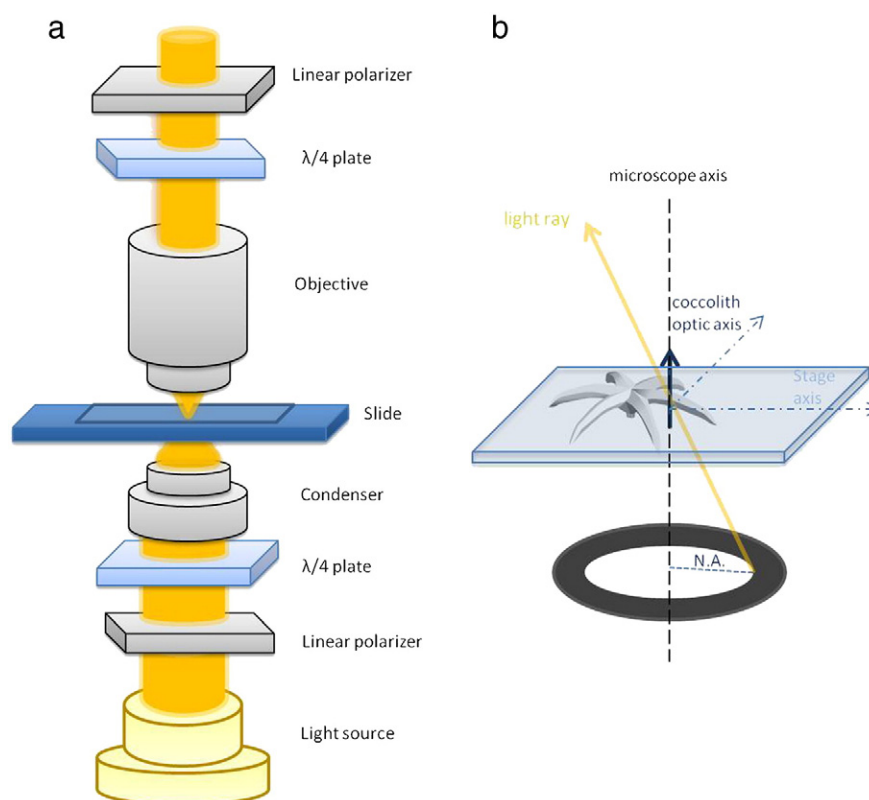


Fig. 1. a: Diagram illustrating how a linearly polarized light microscope can be transformed into a circular one, using two $\lambda/4$ plates. b: Diagram illustrating the relative positions of one light ray, the microscope axis, the optical axis of a coccolith (based on Kameo and Furukawa, 2007) and the stage axis.

extinction at any orientation. All directions become equivalent, meaning that the intensity and color of the light depend only on the thickness of the material and on the inclination of the optic axis, not on its orientation within the plane of the stage.

The situation where an incident ray whose propagation axis is parallel to the optic axis so it is not split into ordinary and extraordinary rays and behaves as an ordinary ray can be avoided because the condenser changes the direction of light, and some rays travel obliquely to the optical axis, improving the visibility of the V units of heterococcoliths or of nannoliths like *Discoaster* (Fig. 1b).

A general description of light propagation in crystals can be found in Born and Wolf (1980). A specific description of how a light ray that comes from the condenser travels through a calcite crystal can be found in Shribak and Oldenbourg (2002). The light that goes across the sample is not a single ray, but a bundle of light rays that travels through the sample at an angle relative to the optical axis of the optical system that varies from zero to a maximum controlled by the condenser aperture, and the phase shift of each ray (called “birefringence retardation” by Shribak and Oldenbourg) depends on the angle between the ray whose direction is changed by the condenser lens and the optical axis of the crystal. When that angle is zero calcite behaves as if it were optically isotropic, so the V units of heterococcoliths or of nannoliths like *Discoaster* appear dark. This situation is shown in Fig. 2, row B: The microscope used in this study is equipped with a P swing-out condenser, which allows the user to swing out the top lens and illuminate the sample with light parallel to the optical axis. When this is done,

the V units of heterococcoliths or nannoliths like *Discoaster* appear dark. The same effect is obtained if the condenser is removed from the optical path. But when the condenser is placed into the optical system as usual (Fig. 2, row C), the V units and nannoliths like *Discoaster* are visible, although they look darker than they would be if they had radial c-axes, but less so that might be expected.

2.2. C-*Calcita* computer program and calibration

One of the main advantages of this technique is that the mass of individual coccoliths can be estimated, therefore we focus our study on this application. To this end, we have developed a program in MatLab named C-*Calcita* (Fig. 3), freely available upon request, which allows the user to measure the gray levels of the pixels of an image and convert their brightness into mass after calibration.

Images were taken as described in the Materials and methods section, with the light level of the microscope kept constant while images are taken. Light and aperture settings on the microscope, as well as parameters such as exposure, gain, and gamma correction on the camera, are fixed by the user at levels appropriate to the sample or set of samples being studied, such that no parts of the coccoliths of interest show saturated light. For example, with the 8-bit camera used, the gray level of a white pixel is 255, but that value varies if a camera with a different bit-depth is used. Beaufort et al. (2014) also use a *Rhabdosphaera* for calibration, setting the light intensity on the microscope to obtain saturation at a thickness of 1.55 μm . This is useful

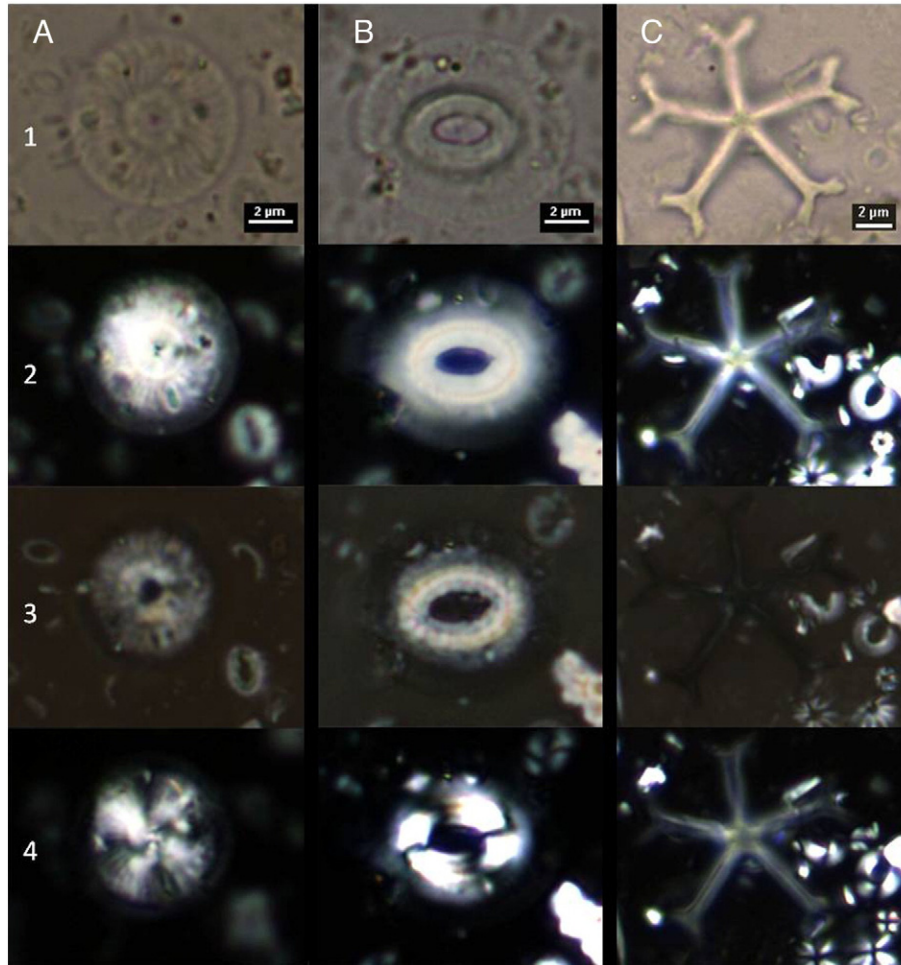


Fig. 2. Comparison of *Calcidiscus leptoporus* (column A), *Coccolithus pelagicus* (column B) and *Discoaster* (column C) images taken with different illuminations, Brightfield (row 1), circularly polarized light with condenser (row 2), circularly polarized light without condenser (row 3), and linearly polarized light with condenser (row 4). Note how the V units in *C. leptoporus* and *C. pelagicus*, and the whole *Discoaster* appear dark when the top lens of the condenser is swung out and coccoliths are illuminated with light parallel to the optical axis.

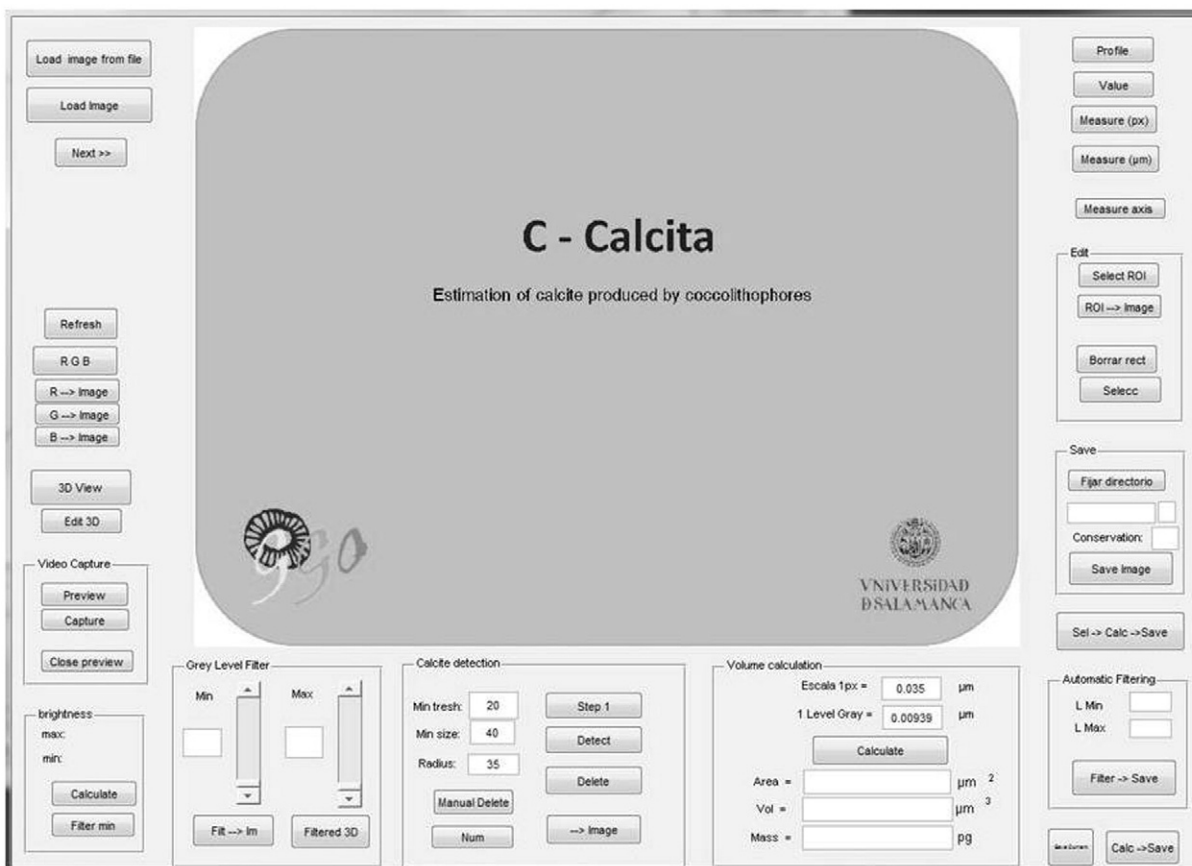


Fig. 3. A screenshot of the C-Calcita program. Various buttons allow the user to (1) load one or several images, (2) choose a directory for saving images, (3) isolate the Red Green or Blue color channels of an image, (4) control a web camera, (5) automatically filter particles by size, (6) detect large calcite particles, (7) delete them from the image, and (8) calculate the total mass of calcite, (9) select or erase a Region Of Interest, (10) measure a length in pixels or in μm , (11) draw a profile, (12) draw a 3D image and (13) gray level filter to remove background noise. Some functions that are outside the scope of this article, such as (4) and (7), remain under development.

if the coccoliths that are going to be measured are all in the range 0–1.55 μm , but not necessary: if they are, for example in the range 0–0.8 μm , and the light intensity on the microscope is adjusted to obtain saturation at a thickness of 0.8 μm , a more soft image will be obtained, as the available gray levels (whose number depends on the bit-depth of the camera) are distributed on a narrower band.

The settings can vary depending on the species composition of the sample and whether or not the slide was made using the decantation method or consists of a filter mounted on a slide, as well as microscope and camera models or even light bulb age. The images are then opened in C-Calcita, where the user can convert the image to grayscale, select an area of an image where a single coccolith is located, eliminate background noise, and then automatically measure the total area of the coccolith, its minor and major axis length and calculate the thickness of each pixel according to its sum of gray level. The volume is then calculated as:

$$\text{Volume} = \sum_{(i=1,n)} \text{pixel surface} \times \text{thickness}$$

where n is the number of pixels of the image selected.

The area of one pixel with the camera, microscope and objective used here is 0.035 μm^2 . This was confirmed using a Leitz micrometer with 0.01 mm intervals. In order to calibrate the gray level value to thickness, a well-preserved *Rhabdosphaera* specimen is used (Fig. 4), because as the spine has a cylindrical shape, its cross-section is circular so its width is equal to its thickness at its central point. A calibration image of a well preserved, in-focus *Rhabdosphaera* spine is taken, using the same type of slide and mounting method as for the subsequent

samples. The background noise, which can occur due to effects such as light reflections or non-perfect polarizers, is eliminated by measuring the gray level on the darkest part of the image and then subtracting its value from the image. The gray level is then measured in the middle of several cross-sections of the *Rhabdosphaera* spine, where width is also measured from the same image, obtaining a set of points that can be used to make a transfer function (Fig. 4). We use a linear transfer function to relate gray level and thickness, following previous studies (e.g. Beaufort, 2005; Cubillos et al., 2012).

A calibration image is taken at the start of every session, and the light level on the microscope is kept constant so that the image can be used to calibrate all the images taken in the same session. Because the visibility of the V-units of heterococcoliths or of nannoliths like *Discoaster* is caused by rays that are not parallel to the c-axis of the crystals, obtained with the condenser, a different calibration of the gray level should ideally be used for those units, as they have a lower brightness than an R-unit of the same thickness. As a first approximation, the same calibration has been used, but this point needs further investigation.

Once the volume is known, the calcite mass is then calculated using a density of 2.7 g/cm^3 . One advantage of the gray level technique is that the error in the gray calibration affects the absolute calculated value for the volume, but does not affect its relative value. The images are stored and can be recalibrated and re-measured if necessary. C-Calcita can also plot 3D representations of coccoliths, draw cross-section profiles, and allow the user to measure the length and width of coccoliths (Figs. 5, 6). Individual images of each measured coccolith are automatically saved with all relevant parameters, and all data can then be exported to Excel.

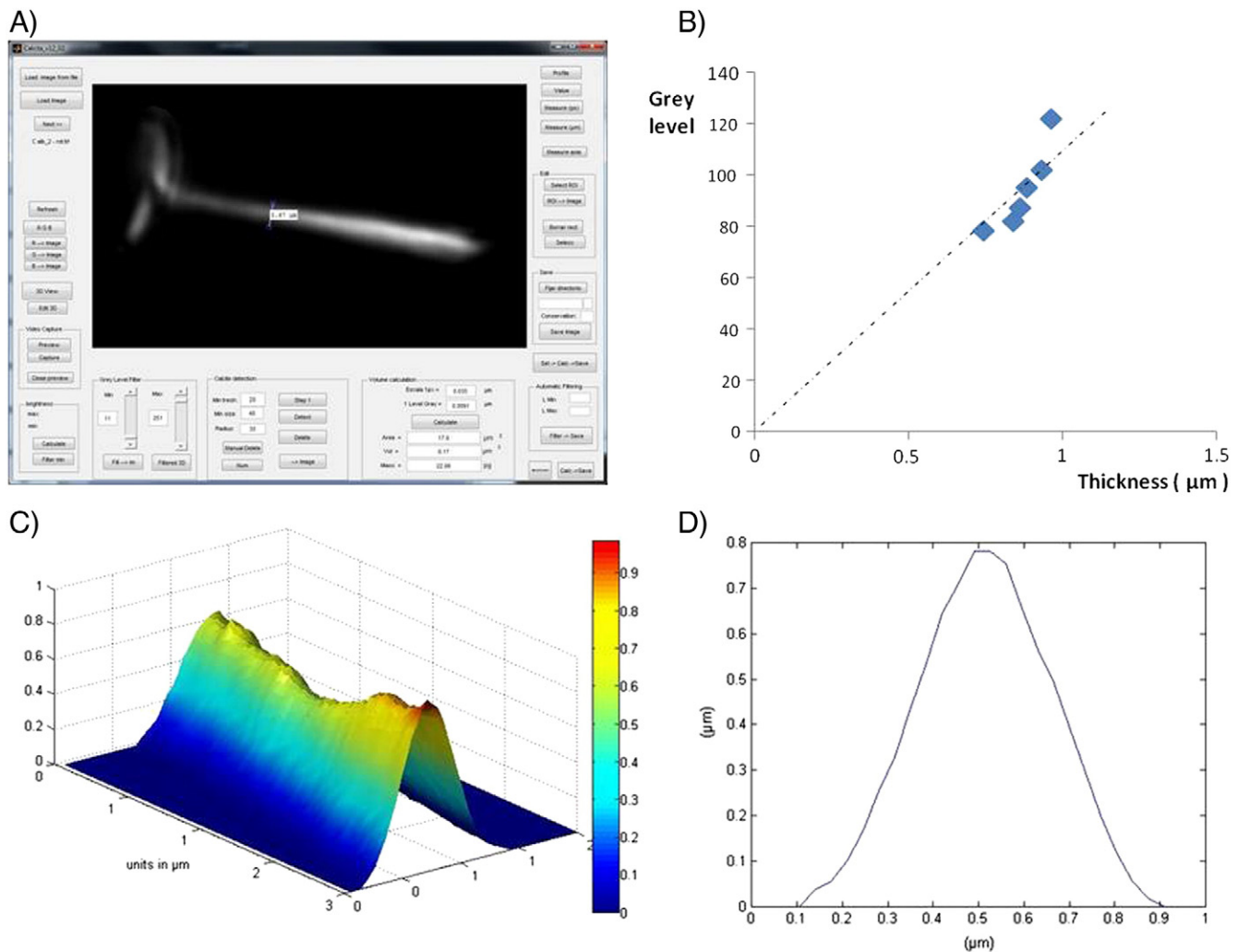


Fig. 4. Calibration of the gray level of the image using a *Rhabdosphaera* spine. The width of the spine can be measured directly from the image, and the gray level value measured in the middle of the spine with the C-Calcita program (A). A linear transfer function is then calculated to estimate the thickness based on the gray level (B). The 3D image (C) and the thickness profile obtained after calibration (D) are similar to what is expected.

3. Case study

Several deep-sea sediment samples have been used in order to highlight the advantages of the technique. For mass calculations, the sample used is from IMAGES core MD 99-2343, obtained by R/V Marion Dufresne during the IMAGES V campaign. The core was obtained in a sediment drift formed by deep contour currents belonging to the southward branch of the Western Mediterranean Deep Water flow, which borders the Valencia Trough from north to south following a cyclonic pattern at a depth of 2000 m (Millot, 1999; Frigola et al., 2008). In order to compare the mass estimates made here with other studies of modern taxa, images from two samples taken near the top of the core (20 and 40 cm) have been used, corresponding to an age of less than 1000 years BP (Sierro et al., 2005). The upper 5 m (Deglaciation and Holocene) of the core consists of homogeneous gray nannofossil and foraminifer silty clay with moderate bioturbation. The coccolith assemblage is dominated by small *Gephyrocapsa* (mainly *Gephyrocapsa aperta*, *Gephyrocapsa ericsonii* and *Gephyrocapsa cf. muellerae* $\leq 3 \mu\text{m}$) and *Emiliania huxleyi* ($<4 \mu\text{m}$). Other common taxa are *Calcidiscus leptoporus*, *Oolithotus* spp., *Umbellosphaera* spp., *Umbilicosphaera* spp., *Helicosphaera carteri*, *Syracosphaera* spp., *Coccolithus pelagicus* and *F. profunda*. Taxa such as *Braarudosphaera bigelowii*, *Pontosphaera* spp., and *Rhabdosphaera clavigera* also appear but in lower abundances.

Sample preservation is good, with minimal dissolution. The five-rayed *Discoaster* images (Fig. 2) are from ODP Site 999A, in the Caribbean Sea, with an age of 7.85 ± 0.04 Ma, corresponding to CN9a biozone (Buitrago et al., 2010).

4. Results and discussion

Several images were taken to compare linear polarization with circular polarization. Figs. 7 and 8 show images of the same field of view taken at different stage orientations with linearly polarized light and with circularly polarized light. In Fig. 7, *Florisphaera* specimens are visible at any orientation when circularly polarized light is used. In Figs. 9 and 10, images of the same specimen for several species are compared, observed with linearly and circularly polarized light. The extinction crosses that appear when coccoliths are observed in linearly polarized light disappear when circularly polarized light is used. Many details are clearer in circularly polarized light images, for example, central area structures in *Gephyrocapsa* spp. (Fig. 9A), *Syracosphaera* spp. (Fig. 9C), *H. carteri* (Fig. 9E), *Pontosphaera* spp. (Fig. 9G) and *C. pelagicus* (Fig. 9H).

In order to compare the average mass in picograms of coccolith taxa calculated using different methods, specimens of each taxon were measured using the C-Calcita software. In Table 1 our results are compared

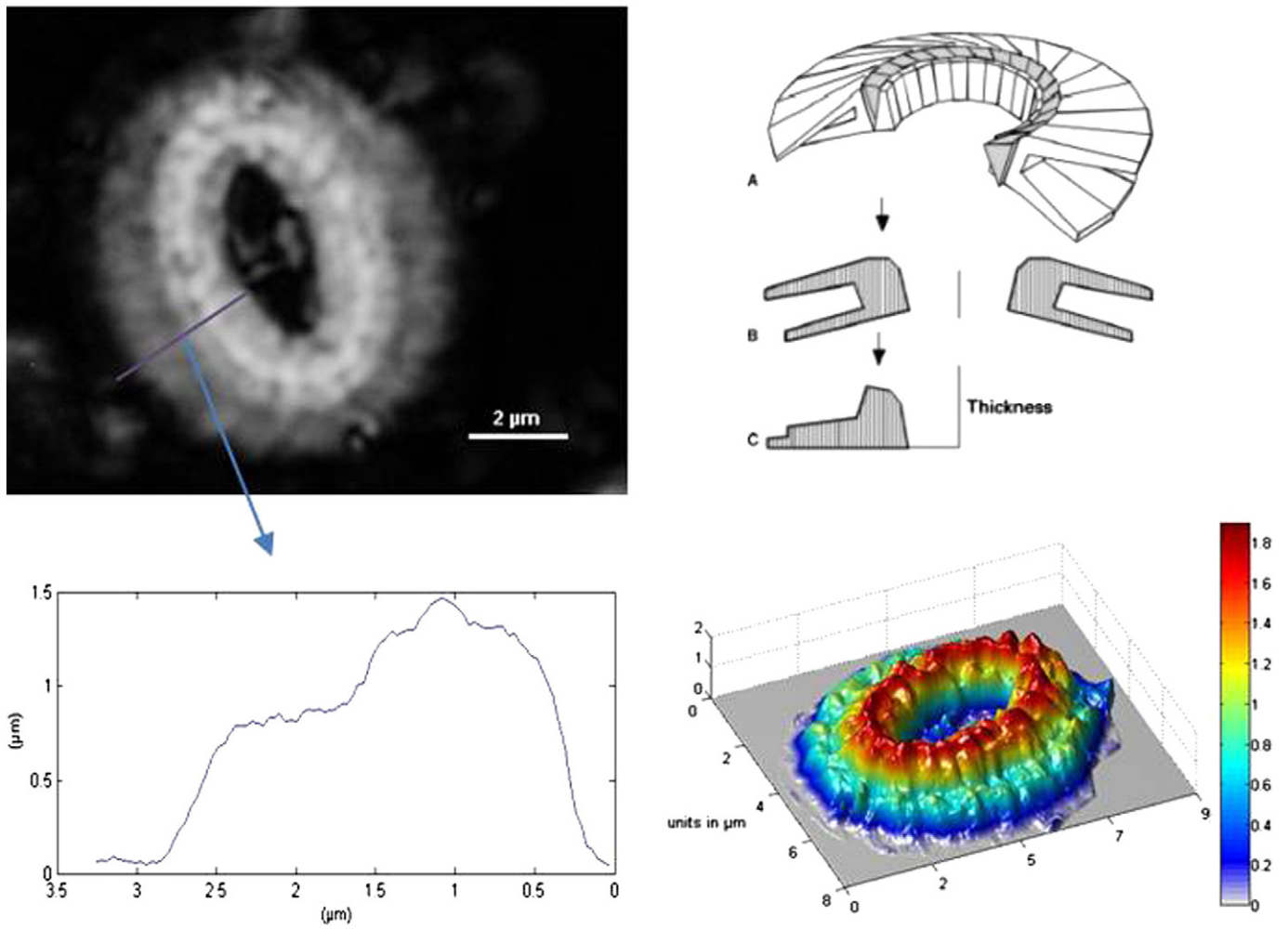


Fig. 5. Image of a *Coccolithus pelagicus* coccolith taken with circularly polarized light, 3D representation and profile of the measured coccolith, compared to the estimation of thickness by Young and Ziveri (2000) (C, upper right) for *Cyclagelosphaera*. While these two coccoliths are only distantly related they are both placoliths and so have very similar shapes in cross-section and hence thickness profiles.

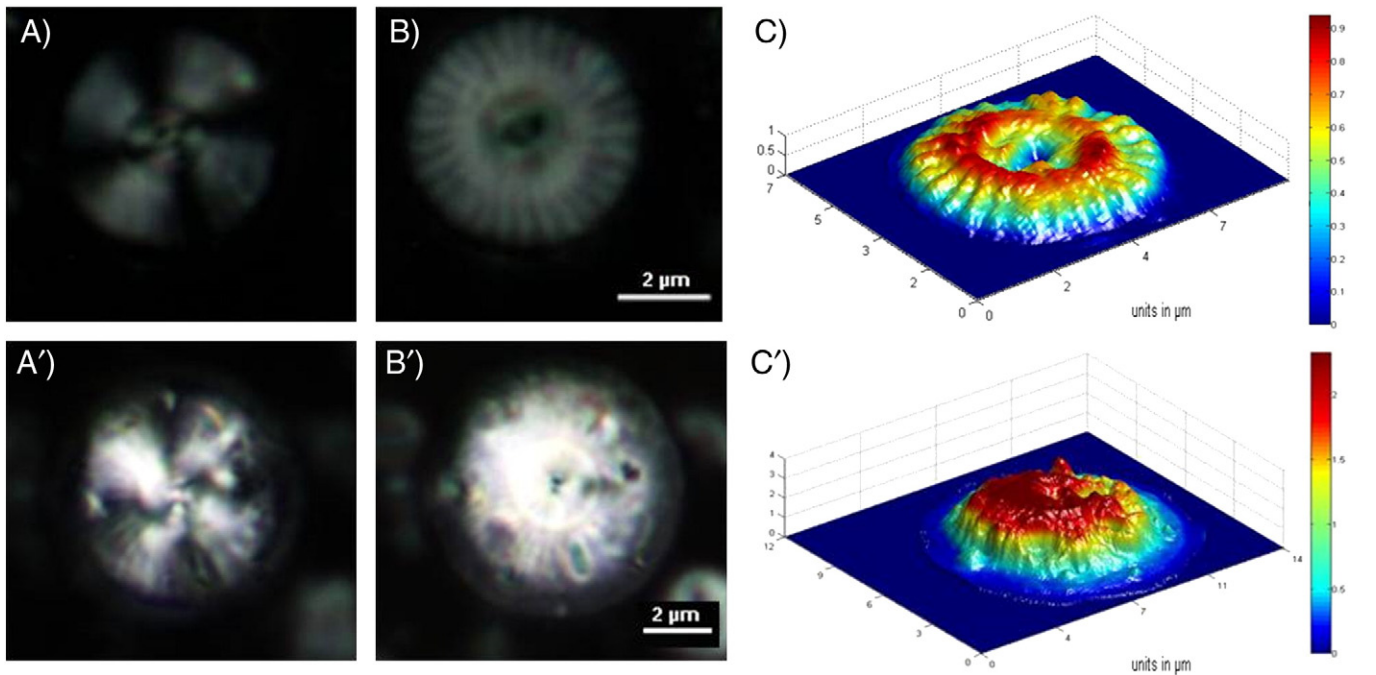


Fig. 6. Estimation of the volume of a coccolith based on its gray level value. Isolated proximal shield of *Calcidiscus* (upper row) and complete coccolith (lower row) under crossed polarized light (A), circularly polarized light (B) and 3D representation of its volume produced in C-Calcita (C).

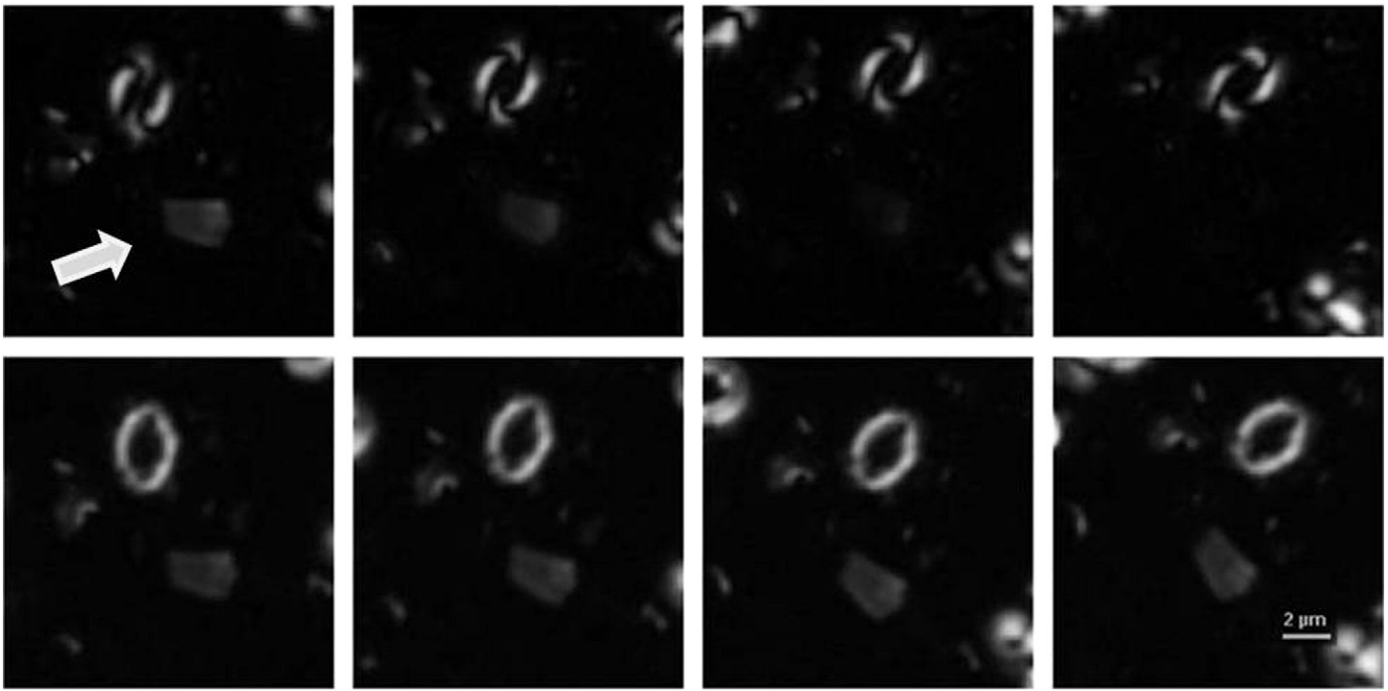


Fig. 7. The same field of view imaged with linearly polarized light (top) and with circularly polarized light (bottom), with the stage rotated at 0°, 15°, 30° and 45°. Note that the *Florisphaera profunda*, marked with an arrow, is not visible at an angle of 45° with linearly polarized light, but if circularly polarized light is used, its brightness remains constant independent of rotation. Note also how the appearance of the small reticulofenestrated coccolith changes in linearly polarized light but is constant in circularly polarized light.

with previous studies. The major and minor axis lengths of each specimen were also measured, Fig. 11, and the circularity was calculated according to Henderiks (2008):

$$\text{Circularity coccolith} = \sqrt{(L \cdot W/L^2)}$$

where L is the length (major axis) and W the width (minor axis).

Our results are consistent with those obtained in previous studies (Table 2). The comparison with Young and Ziveri (2000) is particularly interesting because they use a completely different approach to calculate the mass of a coccolith, yet similar estimates are obtained. Young and Ziveri (2000) derived coccolith volumes by calculating a shape factor (k_s) for each taxon, these k_s values are determined from reconstructions of the cross-section profiles of each taxon, and the volume of each individual coccolith can then be estimated if length (L) is measured, using:

$$\text{Volume} = k_s L^3.$$

Mass can then be calculated by multiplying the volume by the density of calcite. If we compare coccolith masses calculated using the length measurements from this study combined with the Young and

Ziveri (2000) k_s values and formula, with coccolith masses calculated in our study using the circularly polarized light/gray level method that we describe above, the results are strongly correlated (Table 3 and Fig. 12). This is an important result because the Young and Ziveri (2000) technique is based on geometrical properties whereas the method presented here is based on the optical properties of calcite. As a direct measurement of the mass of a single coccolith has not been achieved yet, these results cannot be compared with direct measurements.

Our method can also be compared with the “shape factor” technique, whereby k_s values are calculated mathematically using a cubic regression, rather than based on reconstructed cross-section profiles. In general, coccolith mass is related to the cubic function by the major axis length, as argued by Young and Ziveri (2000). This relationship is shown in Fig. 11. The k_s values calculated using the measured length values are compared with those based on geometrical model values calculated by Young and Ziveri (2000) in Table 4. For example, the measured mass and the calculated mass for *H. carteri* following Young and Ziveri (2000) are represented in Fig. 12, and the measured mass and the calculated function of *H. carteri* are represented in Fig. 13. Results for k_s values obtained with our technique agree remarkably well with those obtained using the independent Young and Ziveri “shape factor” technique, even though Young and Ziveri (2000) estimated an error margin of about $\pm 20\%$ for their methodology. The largest

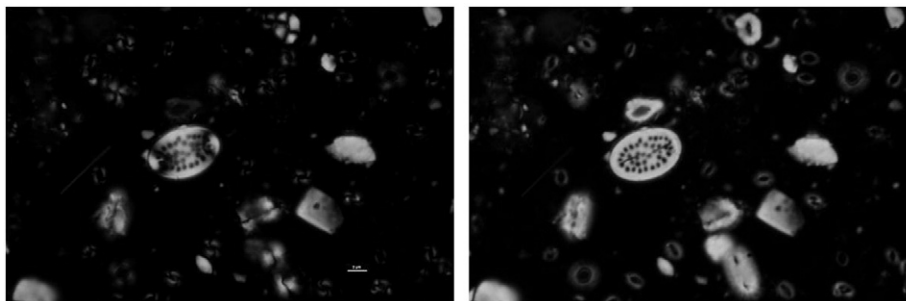


Fig. 8. Comparison between an identical field of view imaged with linearly polarized light (left) and with circularly polarized light (right).

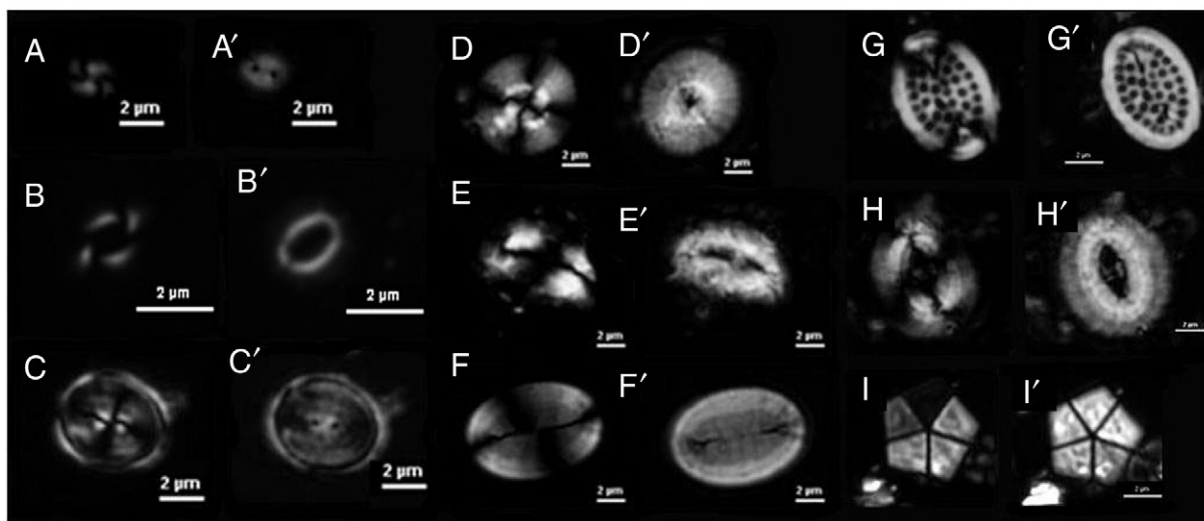


Fig. 9. Comparison of images of coccoliths taken with linearly polarized light (A to I) and with circularly polarized light (A' to I'): A) small *Gephyrocapsa*, B) *Emiliana huxleyi*, C) *Syracosphaera* spp., D) *Calcidiscus leptoporus*, E) *Helicosphaera carteri*, F) *Pontosphaera discopora*, G) *Pontosphaera multipora*, H) *Coccolithus pelagicus*, I) *Braarudosphaera bigelowii*.

discrepancy between the two methods is the case of *R. clavigera*, whose mass seems to be lower based on our methods versus those of Young and Ziveri (2000).

Bollmann (2014) also discussed micropaleontological applications of circular polarization. However in this paper, we further the application of this technique by presenting a new computer program for estimating coccolith mass, as well as a new calibration method using a *Rhabdosphaera* specimen to determine the relationship between gray level and coccolith thickness. Our results are compared with those of Bollmann (2014) in Table 2 and Fig. 14. Mass estimates are within a similar range of values taking into account differences in mean coccolith length. As shown in Fig. 14, the mass obtained for some taxa like *H. carteri* and *C. pelagicus* is slightly lower using our method. These discrepancies could be a result of different geographical locations, the inclusion of other species of *Helicosphaera* in the results of Bollmann (2014), or the fact that the low number of individual coccoliths measured in Bollmann (2014) makes a meaningful comparison difficult.

4.1. Advantages of circular polarization

This technique has several advantages for observing coccoliths:

- (1) There is no extinction of nannolith at any orientation. One example is *F. profunda*. Because this species is formed of single crystals with optical axes in the plane of the nannolith, their brightness when they are observed with linearly polarized light depends on their orientation with respect to the axis of the analyzer, varying from almost zero to a maximum. Therefore, all the nannoliths in a field of view cannot be detected and measured in a single image taken with linearly polarized light. If circularly polarized

light is used, all nannoliths such as *Florisphaera* can be detected and measured in one image, at any orientation of the stage (Fig. 7).

- (2) The images of radial coccoliths do not have the pseudo-extinction crosses typical under cross polarized light. Their brightness and color depend only on their shape (Figs. 2, 7, 8, 9, 10). This makes their appearance more consistent and aids significantly in observing central area structures and in determining if structures are axially aligned or slightly oblique.
- (3) The use of circularly polarized light, combined with oblique illumination, makes all coccoliths visible (Fig. 2).

Circularly polarized light can be used instead of linearly polarized light for biometric studies and for species identification, but the most important application is the calculation of coccolith mass, to better estimate the amount of calcite produced by coccolithophores.

4.1.1. Biometry

When circularly polarized light is used, the shape of a coccolith is closer to its real shape than under linearly polarized light, because there are no distortions related to the extinction pattern. This permits measurements to be more accurate because the coccolith's boundaries are clearly defined. When observed in cross-polarized light, the brightness and color of an object depend on its thickness, its orientation and its birefringence index. As most modern and Pleistocene coccoliths are less than 1.5 μm thick, the high birefringence of calcite means that they show first-order polarization colors, dark gray to white. Within this range the brightness of calcite is proportional to its thickness, so the gray level intensity can be used to estimate their thickness (Beaufort, 2005), taking into account the c-axis inclination effect.

Table 1

Results obtained in this study using circularly polarized light and gray level.

Taxa	Coccoliths measured	Mass mean value (pg)	Standard deviation	Mean length (μm)	Mean width (μm)	Mean circularity (μm)
<i>Emiliana huxleyi</i>	138	2.61	0.98	3.22	2.50	0.88
Small <i>Gephyrocapsa</i> spp.	87	3.56	1.83	2.99	2.38	0.88
<i>Florisphaera profunda</i>	110	0.89	0.39	2.62	1.78	0.83
<i>Helicosphaera carteri</i>	143	98.42	34.09	8.83	5.59	0.80
<i>Rhabdosphaera clavigera</i>	41	16.84	5.96	11.89	2.77	0.48
<i>Syracosphaera</i> spp.	53	10.23	5.67	6.19	4.61	0.86
<i>Coccolithus pelagicus</i>	51	216.54	75.74	11.69	9.54	0.90

Table 2
Results obtained in this study compared with previous studies.

Taxa	Mean value (this study)	Beaufort and Heussner (1999)	Young and Ziveri (2000)	Beaufort (2005)	Bollmann (2014)
	Mediterranean (MD99-2343)	Cantabrian Sea	North Atlantic	Indian Ocean	Cantabrian Sea/South Atlantic
<i>Emiliania huxleyi</i>	2.61	2.9	1.2–4.6	5.3	1.7 (small placoliths/ <i>E. huxleyi</i>)
Small <i>Gephyrocapsa</i> spp.	3.56	5.81	3.6 (<i>G. ericsonii</i>)–8.0 (<i>G. muelleriae</i>)	–	–
<i>Florisphaera profunda</i>	0.89	6.8	1.3	2.2	1.0
<i>Helicosphaera carteri</i>	98.4	143	135	142	57.1
<i>Rhabdosphaera clavigera</i>	16.8	46	67.5	–	–
<i>Syracosphaera</i> spp.	10.2	12	13.5 (<i>S. pulchra</i>)	10–22	5.9
<i>Coccolithus pelagicus</i>	216.5	151	398 (large)–99 (small)	–	111.3

4.1.2. Identification

The circular polarization technique can also be useful for identifying taxa. Descriptions of taxa were originally made by observing coccoliths with linear polarization because the extinction pattern in cross polarized light provides information on the crystallographic orientation of the elements of coccoliths, valuable for taxonomy. Nevertheless, the observation of coccoliths under circularly polarized light can be a useful tool because there is no need to rotate the stage in order to identify all features and fine scale details such as size, central area, bridge, opening or pores, and for the detection of all the coccoliths that are present in a field of view.

The use of circularly polarized light can help overcome some of the issues that automatic systems for identifying and counting the different taxa in a sample currently have (e.g. Beaufort and Dollfus, 2004). For example, there is no need to rotate the stage or the polarizers and compare several images of the same field of view, because all of the coccoliths present can be seen at once, so only one image is necessary. Since the shape and brightness of coccoliths are constant, rather than dependent on the orientation of the specimen, the use of circularly polarized light will improve automatic identification where systems like neural networks are trained to identify different images and shapes as belonging to the same taxon.

4.1.3. Calcite produced by coccolithophores

Coccolithophores are one of the main components of the phytoplankton. They grow in most of the oceans, and it is estimated that, since the Jurassic era, coccoliths have contributed between 60% and 90% of the calcareous pelagic sediments (Berger and Roth, 1975). They have an important role in the carbon cycle, because they release and take up carbon dioxide, and transport calcite to the sea floor. A key factor for the understanding of the carbon cycle is the balance between production and dissolution of CaCO_3 in the oceans (Archer et al., 2000), as well as the degree of calcification and the response of coccolithophores to changes in ocean pH (The Royal Society, 2005; Halloran et al., 2008; Beaufort et al., 2011a). However, the amount of calcite produced by coccolithophores, and the proportion that is buried in ocean sediments, is poorly known. This is in part due to the difficulty of determining the

mass of a single coccolith because they are too small (1 to 10 μm) to be individually isolated and weighed (Beaufort, 2005).

The most important application of this new technique is the calculation of the amount of calcite produced by coccolithophores. A single coccolith can be measured, or the technique can be applied to several fields of view, allowing the estimation of total calcite in a sample. Several methods have been proposed to estimate the amount of calcite that coccoliths represent in a given sample:

- (1) The easiest method is to weigh the fine fraction of bulk sediment (e.g., Broerse et al., 2000), assuming that this fraction is entirely composed of coccoliths. However, this is a rather inaccurate approximation because the fine fraction is not only composed by coccoliths, but also by other particles such as clay, siliceous microfossils or foraminifer fragments.
- (2) Another method is to estimate the mass of a coccolith based on the geometry of an idealized coccolith (Young and Ziveri, 2000). The total amount of CaCO_3 can be estimated by multiplying the total number of coccoliths belonging to each taxon by the estimated mass of a coccolith belonging to that taxon. Correction can be made for size changes, but not for additional variation due for example to differences in degree of calcification or dissolution.
- (3) The third existing method to estimate the amount of calcite is based on the gray level values of an image taken under the microscope. Given that the gray level intensity of coccoliths when observed with a polarized microscope can be used to estimate their thickness, the volume of a coccolith can be determined if a photo is taken with a digital camera and the area and gray level of each pixel are measured. This technique was originally proposed by Beaufort (2005) using images taken with linearly polarized light, but with some limitations meaning that the technique

Table 3

Correlation between the mass of single coccoliths measured in this study using circularly polarized light and gray level compared with the value obtained using the Young and Ziveri (2000) methodology and the same coccolith length measurements.

Species	Correlation coefficient
<i>Emiliania huxleyi</i>	0.64
<i>Gephyrocapsa oceanica</i>	0.71
<i>Florisphaera profunda</i>	0.67
<i>Helicosphaera carteri</i>	0.92
<i>Rhabdosphaera clavigera</i>	0.61
<i>Syracosphaera</i> spp.	0.45
<i>Coccolithus pelagicus</i>	0.92

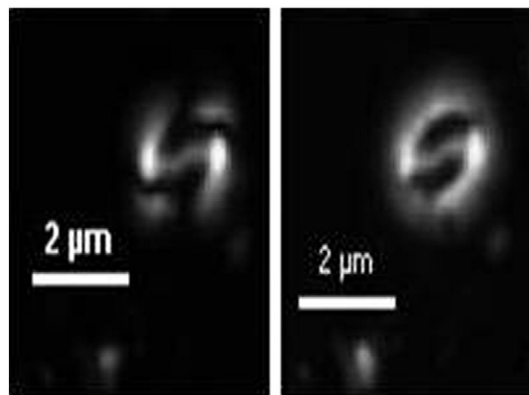


Fig. 10. Small *Gephyrocapsa* coccolith. The length, width and the angle of the bridge can be more accurately measured if circularly polarized light is used (right), rather than linearly polarized light (left).

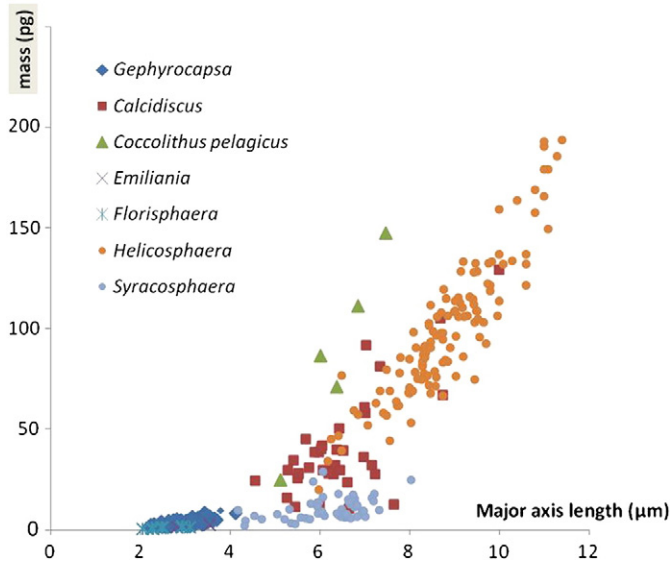


Fig. 11. Major axis length of single coccoliths versus their measured mass. The graph is similar to a cubic function of the type $y = a x^3$.

cannot be applied to all coccoliths. Briefly, these limitations include (1) the technique cannot be applied to calcareous nannofossils that have crystals with an optical axis parallel to the radial axis of symmetry, such as *Discoaster* (e.g. [Kameo and Furukawa, 2007](#)), (2) The brightness of some calcareous nannofossils (e.g. *Ceratolithus*, *Florisphaera*) under linearly polarized light depends on the stage orientation with respect to the axis of the analyzer, therefore some nannofossils are totally extinguished at certain orientations and the measured gray level and calculated mass vary depending on the stage orientation and (3) In non-circular coccoliths the sum of gray level for the whole fossil under crossed-polarized light varies with the orientation of the stage with respect to the axis of the analyzer. This is especially obvious with coccoliths as the *Zygodiscals* (e.g. *Helicosphaera*,

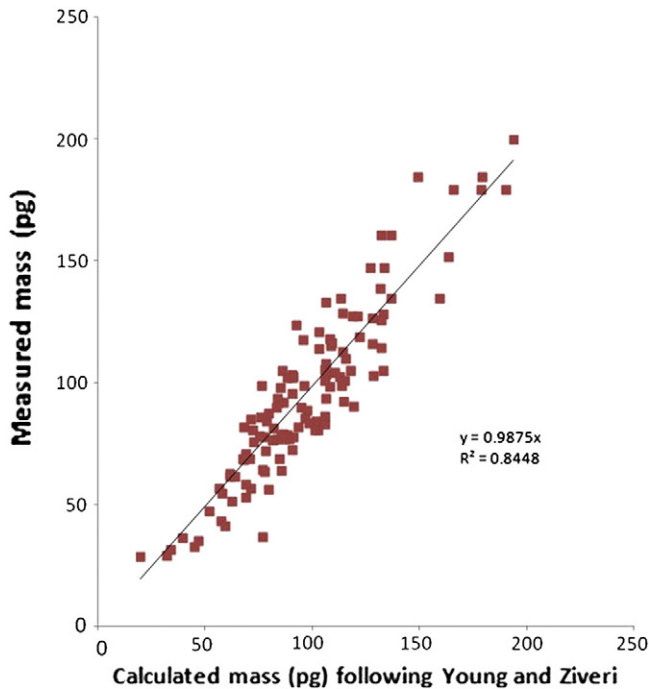


Fig. 12. Comparison of measured mass values and those calculated using the [Young and Ziveri \(2000\)](#) methodology for *Helicosphaera* coccoliths.

Table 4

Comparison of k_s values calculated using mass and length values obtained by circular polarization and gray level measurements with those calculated by [Young and Ziveri \(2000\)](#) using geometrical models. K_s values have been calculated using a cubic regression fit, and S.d. is the standard deviation for the individual values.

Species	K_s calculated	S.d.	K_s Young and Ziveri (2000)
<i>Emiliana huxleyi</i>	0.026	0.009	0.02
<i>Gephyrocapsa oceanica</i>	0.046	0.018	0.05
<i>Florisphaera profunda</i>	0.017	0.009	0.04
<i>Helicosphaera carteri</i>	0.049	0.010	0.05
<i>Rhabdosphaera clavigera</i>	0.003	0.001	0.025
<i>Syracosphaera</i> spp.	0.014	0.009	0.015 (small)
<i>Coccolithus pelagicus</i>	0.044	0.008	0.06

Pontosphaera). This means that the sum of gray level and calculated mass are dependent on the orientation of the stage. [Beaufort et al. \(2011b\)](#) have improved this technique by digitally combining three images captured at different orientations relative to the polarizing planes. However this technique needs relatively sophisticated equipment and the obtained images cannot be viewed directly in the microscope. The use of circularly polarized light requires simpler equipment and results in an image that can be directly viewed in the microscope. While this article was in revision process, a new calibration protocol that includes the use of circularly polarized light was published by [Beaufort et al., \(2014\)](#).

Other studies have also improved and expanded the gray-level technique using linearly polarized light, for example, [Cubillos et al. \(2012\)](#) applied it to *C. pelagicus*, estimating the mass of the whole coccolith based on morphometric analysis in brightfield and measuring only the gray level in the central area in crossed-polarized light.

The use of circularly polarized light can overcome the major limitations and systematic errors of the technique reported by [Beaufort \(2005\)](#), expanding the gray level technique to all types of coccoliths, allowing the mass of a single coccolith to be determined and eliminating the limitations (2) and (3) described above. The particular limitation (1) of calcareous nannofossils that have crystals with an optical axis parallel to the radial axis of symmetry, such as *Discoaster* and

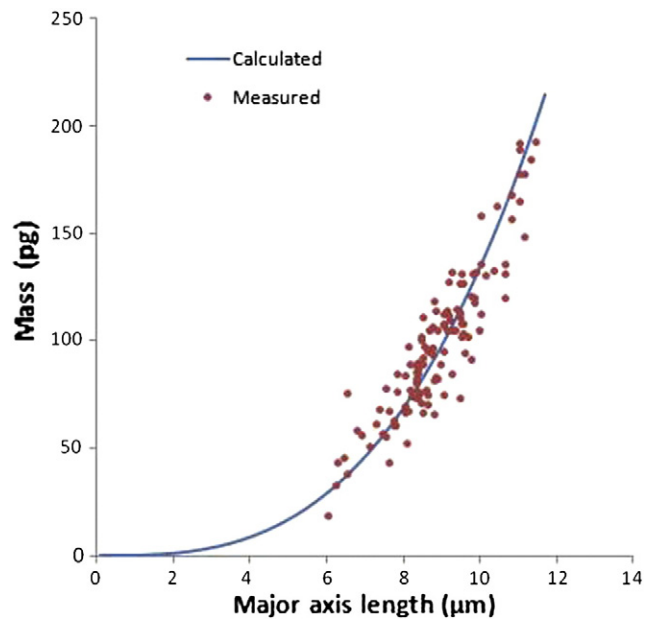


Fig. 13. Measured mass of *Helicosphaera carteri* single coccoliths (dots) and representation of the calculated relationship $Mass = k_s l^3$ (line).

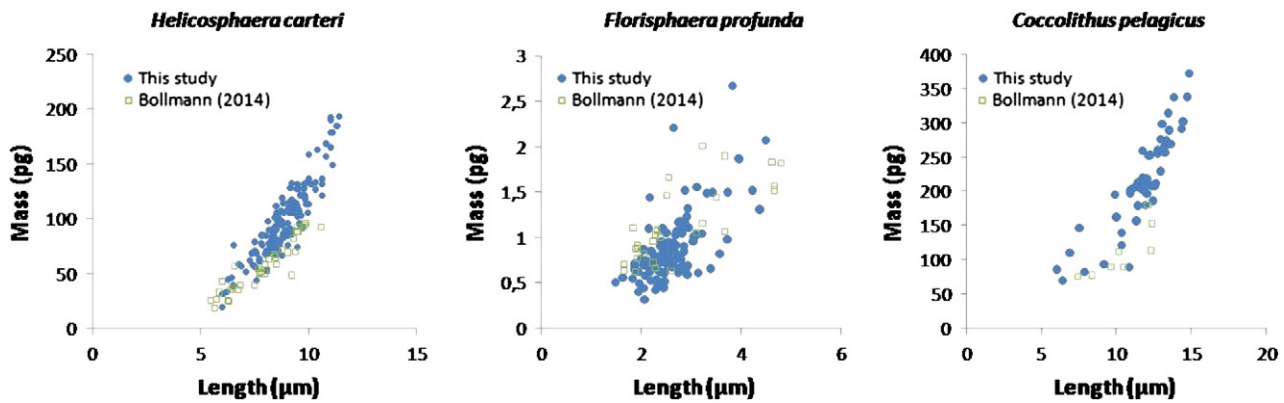


Fig. 14. Comparison of values measured for individual coccoliths compared with the results obtained in Bollmann (2014).

some parts of *C. pelagicus*, can be at least reduced. This is not a result of the use of circularly polarized light in itself, but because of the oblique illumination obtained with the microscope condenser, which means that the light travels through the specimen at an angle that is not the same as the almost vertical optical axes of the V-units of the coccoliths (e.g., Young et al., 1992), meaning that both the R and V units are visible.

5. Conclusions

- (1) The use of circularly polarized light is proposed for the study of calcareous nanofossils. A crossed polarizer microscope can be adapted to give circularly polarized illumination by using two $\lambda/4$ plates, one placed above the polarizer and the other below the analyzer.
- (2) When observed with circularly polarized light, coccoliths do not show extinction patterns, and so remain the same shape independent of the angle of the stage, which has a number of important applications in biometry, identification and calculation of the amount of calcite produced by coccolithophores.
- (3) The visibility of nannoliths such as *Discoaster* or of the V-units of the heterococcoliths such as *C. pelagicus* does not depend on the use of linearly or circularly polarized light, but on the oblique illumination given by the condenser.
- (4) The mass estimates obtained using the circular polarization/gray level method and the program C-Calcita are similar to those obtained in previous studies using other techniques.
- (5) Further investigation on the use of *Rhabdosphaera* spp. or other taxa with similar optical characteristics to calibrate the visibility of the V-units of the coccoliths obtained with the condenser is needed, because a different gray level calibration might be necessary for those units.

Acknowledgments

The authors would like to acknowledge the reviewers, J. Young and J. Henderiks, for their useful suggestions and comments and to Clara Bolton for her English help. This study was supported by the Spanish Ministerio de Economía y Competitividad projects CGL2009-08651 and CTM2012-38248.

References

- Archer, D., Winguth, A., Lea, D., Mahowald, N., 2000. What caused the glacial–interglacial atmospheric $p\text{CO}_2$ cycles? *Rev. Geophys.* 38 (2), 159–189.
- Bass, M. (Ed.), 2009. *Handbook of Optics, Third Edition Volume I*. McGraw Hill.
- Beaufort, L., 2005. Mass estimates of coccoliths using the optical properties (birefringence) of calcite. *Micropaleontology* 51, 289–297.
- Beaufort, L., Dollfus, D., 2004. Automatic recognition of coccoliths by dynamical neural networks. *Mar. Micropaleontol.* 51, 57–73.
- Beaufort, L., Heussner, S., 1999. Coccolithophorids on the continental slope of the Bay of Biscay—production, transport and contribution to mass fluxes. *Deep-Sea Res. II Top. Stud. Oceanogr.* 46, 2147–2174.
- Beaufort, L., Probert, I., de Garidel-Thoron, T., Bendif, E.M., Ruiz-Pino, D., Metz, N., Goyet, C., Buchet, N., Coupel, P., Grelaud, M., Rost, B., Rickaby, R.E.M., de Vargas, C., 2011a. Sensitivity of coccolithophores to carbonate chemistry and ocean acidification. *Nature* 476, 80–83.
- Beaufort, L., Su, X., de Garidel-Thoron, T., Barbarin, N., Gally, Y., 2011b. Collapse of coccolith calcification after 1940 recorded in a 500-years long time series (core MD05-2917 – Western Pacific) with a yearly resolution. *Journées de Paléocéanographie IMAGES-France, CEREGE, CCSd (Centre pour la Communication Scientifique Directe)*.
- Beaufort, L., Barbarin, N., Gally, Y., 2014. Optical measurements to determine the thickness of calcite crystals and the mass of thin carbonate particles such as coccoliths. *Nat. Protoc.* 9, 633–642. <http://dx.doi.org/10.1038/nprot.2014.028>.
- Berger, W.H., Roth, P.H., 1975. *Oceanic micropaleontology: progress and prospects*. *Rev. Geophys. Space Phys.* 13, 561–585.
- Bollmann, J., 2014. Technical note: mass approximation of coccoliths using a circular polarizer and interference colour derived retardation estimates – (the CPR method). *Biogeosciences* 11, 1899–1910. <http://dx.doi.org/10.5194/bg-11-1899-2014>.
- Born, M., Wolf, E., 1980. *Principles of Optics*, 6th ed. Pergamon Press, Elmsford, N.Y.
- Broerse, A.T.C., Ziveri, P., Honjo, S., 2000. Coccolithophore (CaCO_3) flux in the Sea of Okhotsk: seasonality, settling and alteration processes. *Mar. Micropaleontol.* 39 (1–4), 179–200.
- Buitrago, Y.M., Flores, J.-A., Sierro, F.J., 2010. Calcareous nanofossils Upper Miocene biostratigraphy and biochronology at western equatorial Atlantic (ODP Site 999). *Rev. Esp. Micropaleontol.* 42 (3), 301–303.
- Cubillos, J.C., Henderiks, J., Beaufort, L., Howard, W.R., Hallegraeff, G.M., 2012. Reconstructing calcification in ancient coccolithophores: individual coccolith mass and morphology of *Coccolithus pelagicus* (sensu lato). *Mar. Micropaleontol.* 92–93, 29–39.
- Flores, J.A., Sierro, F.J., 1997. Revised technique for calculation of calcareous nanofossil accumulation rates. *Micropaleontology* 43 (3), 321–324.
- Frigola, J., Moreno, A., Cacho, I., Canals, M., Sierro, F.J., Flores, J.A., Grimalt, J.O., 2008. Evidence of abrupt changes in Western Mediterranean Deep Water circulation during the last 50 kyr: a high-resolution marine record from the Balearic Sea. *Quat. Int.* 181, 88–104.
- Fuertes, M.A., Flores, J.-A., Sierro, F.J., 2013. A new technique for observing calcareous nanofossils: methodology and application. (Oral presentation at International Nannoplankton Association, 15–19 September 2013, Reston, Virginia, USA). *Abstr. J. Nannoplankton Res.* 33 (59).
- Halloran, P.R., Hall, I.R., Colmenero-Hidalgo, E., Rickaby, R.E.M., 2008. Evidence for a multispecies coccolith volume change over the past two centuries: understanding a potential ocean acidification response. *Biogeosciences* 5, 1651–1655.
- Hecht, E., 2002. *Optics*, 4th ed. Addison Wesley.
- Henderiks, J., 2008. Coccolithophore size rules – reconstructing ancient cell geometry and cellular calcite quota from fossil coccoliths. *Mar. Micropaleontol.* 67, 1431–1454.
- Kameo, K., Furukawa, N., 2007. Analysis of crystallographic directions in *Florisphaera profunda*, *Braarudosphaera bigelowii* and Neogene discoasters: preliminary report on nannolith crystallography. *J. Nannoplankton Res.* 29 (1), 19–23.
- Kamptner, H., 1954. *Das mikroskopische Studium des Skelettes der Coccolithineen*. (*Kalkflagellaten*). *Mikroskopie* 7, 232–244.
- Millot, C., 1999. Circulation in the western Mediterranean Sea. *J. Mar. Syst.* 20, 423–442.
- Murphy, D.B., 2001. *Fundamentals of Light Microscopy and Electronic Imaging*. Wiley – Liss, Inc.
- Saleh, Bahaa E.A., Teich, Malvin Carl, 1991. *Fundamentals of Photonics*. John Wiley & Sons, Inc.
- Shribak, M.I., Oldenbourg, R., 2002. Scanning aperture polarized light microscope: observation of small calcite crystals using oblique illumination. In: Conchello, J.A., Cogswell, C.J., Wilson, T. (Eds.), *Three-Dimensional and Multidimensional Microscopy: Image Acquisition and Processing IX*. Proc. SPIE 4621, pp. 104–109.
- Sierro, F.J., Hodell, D.A., Curtis, J.H., Flores, J.A., Reguera, I., Colmenero-Hidalgo, E., Barceña, M.A., Cacho, J.O.I., Frigola, J., Canals, M., 2005. Impact of Iceberg melting on Mediterranean thermohaline circulation. *Paleoceanography* 20, 1–13.
- The Royal Society, 2005. *Ocean Acidification Due to Increasing Atmospheric Carbon Dioxide*. The Royal Society, London, UK.

- Wilbur, K.M., Watabe, N., 1963. Experimental studies on calcification in mollusks and the alga *Coccolithus huxleyi*. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 109, 82–112.
- Young, J.R., Henriksen, K., 2003. Biomineralization within vesicles: the calcite of coccoliths. In: Dove, P.M., De Yoreo, J.J., Weiner, S. (Eds.), *Biomineralization. Reviews in Mineralogy and Geochemistry* 54, pp. 189–215.
- Young, J.R., Ziveri, P., 2000. Calculation of coccolith volume and its use in calibration of carbonate flux estimates. *Deep-Sea Res. II Top. Stud. Oceanogr.* 47, 1679–1700.
- Young, J.R., Didymus, J.M., Mann, S., 1991. On the reported presence of vaterite and aragonite in coccoliths of *Emiliana huxleyi*. *Bot. Mar.* 34, 589–591.
- Young, J.R., Didymus, J.M., Bown, P.R., Prins, B., Mann, S., 1992. Crystal assembly and phylogenetic evolution in heterococcoliths. *Nature* 356, 516–518.

II. Artículo publicado en la revista Nature Communications

Bolton, C.T., Hernández-Sánchez, M.T, **Fuertes, M.A.**, González-Lemos, S., Abrevaya, L., Mendez-Vicente, A., Flores, J.A., Probert, I., Giosan, L., Johnson, J. y Stoll, H.M., 2016. Decrease in coccolithophore calcification and CO₂ since the middle Miocene. Nature Communications, 7, article number 10284. doi:10.1038/ncomms10284

ARTICLE

Received 30 Apr 2015 | Accepted 26 Nov 2015 | Published 14 Jan 2016

DOI: 10.1038/ncomms10284

OPEN

Decrease in coccolithophore calcification and CO₂ since the middle Miocene

Clara T. Bolton^{1,2}, María T. Hernández-Sánchez¹, Miguel-Ángel Fuertes³, Saúl González-Lemos¹, Lorena Abrevaya¹, Ana Mendez-Vicente¹, José-Abel Flores³, Ian Probert⁴, Liviu Giosan⁵, Joel Johnson⁶ & Heather M. Stoll¹

Marine algae are instrumental in carbon cycling and atmospheric carbon dioxide (CO₂) regulation. One group, coccolithophores, uses carbon to photosynthesize and to calcify, covering their cells with chalk platelets (coccoliths). How ocean acidification influences coccolithophore calcification is strongly debated, and the effects of carbonate chemistry changes in the geological past are poorly understood. This paper relates degree of coccolith calcification to cellular calcification, and presents the first records of size-normalized coccolith thickness spanning the last 14 Myr from tropical oceans. Degree of calcification was highest in the low-pH, high-CO₂ Miocene ocean, but decreased significantly between 6 and 4 Myr ago. Based on this and concurrent trends in a new alkenone ϵ_p record, we propose that decreasing CO₂ partly drove the observed trend via reduced cellular bicarbonate allocation to calcification. This trend reversed in the late Pleistocene despite low CO₂, suggesting an additional regulator of calcification such as alkalinity.

¹Geology Department, Oviedo University, Arias de Velasco s/n, 33005 Oviedo, Asturias, Spain. ²Aix-Marseille University, CNRS, IRD, CEREGE UM34, 13545 Aix en Provence, France. ³Grupo de Geociencias Oceánicas, Geology Department, University of Salamanca, Salamanca 37008, Spain. ⁴CNRS, Sorbonne Universités-Université Pierre et Marie Curie (UPMC) Paris 06, FR2424, Roscoff Culture Collection, Station Biologique de Roscoff, Place Georges Teissier, 29680 Roscoff, France. ⁵Department of Geology and Geophysics, Woods Hole Oceanographic Institution, 266 Woods Hole Road, MS# 22, Woods Hole, Massachusetts 02543-1050, USA. ⁶University of New Hampshire, Department of Earth Sciences, 56 College Road, James Hall, Durham, New Hampshire 03824-3589, USA. Correspondence and requests for materials should be addressed to C.T.B. (email: bolton@cerege.fr) or to H.M.S. (email: hstoll@geol.uniovi.es).

Coccolithophores, a group of unicellular marine phytoplankton, are the only primary producers of biogenic calcite in the open ocean. During their diploid life-cycle stage, calcifying coccolithophores intracellularly produce calcite plates called heterococcoliths. These circular to elliptical coccoliths are extruded through the cell wall to form an exoskeleton, usually composed of a single layer of calcite plates, called a coccosphere. Coccolithophores play an important role in the carbon cycle because they promote the sinking of particulate organic carbon to the deep ocean¹. Changes in their production of organic carbon and calcification can alter the balance between the organic and inorganic carbon pumps, with strong feedbacks on climate and atmospheric carbon dioxide concentrations ($p\text{CO}_2$) on seasonal to geological timescales². Despite the importance of coccolithophore calcification to biogeochemical cycles and the large range in degree of cell-calcification (defined here as the amount of calcite per unit surface area of the cell) observed both among and within modern species, it is unclear whether specific factors drive changes in cell-calcification state of the ocean's coccolithophore populations on evolutionary timescales. Rapid changes in ocean dissolved CO_2 concentration ($[\text{CO}_{2\text{aq}}]$), pH, temperature and surface-water stratification in the coming centuries may exert selective pressure on coccolithophore calcification^{3,4}. Short-term experiments reveal an array of species- and strain-specific physiological responses to elevated $[\text{CO}_{2\text{aq}}]$ ^{4–9}. However, selection experiments lasting around a year show that the negative effects of short term (<10 generations) high $p\text{CO}_2$ exposure on coccolithophore calcification and growth are partly reversed for populations that have been exposed to long term (about 500 generations) high $p\text{CO}_2$ conditions^{10,11}. Such adaptability is consistent with the geological data indicating that coccolithophores were more ubiquitous and common in the warm, high- CO_2 ocean of the earlier Cenozoic, with larger coccoliths and cells^{12,13}. Recent work has shown that calcification competes with photosynthesis for intracellular bicarbonate (HCO_3^-), and that multiple species of coccolithophores reallocate HCO_3^- transport from calcification to photosynthesis at low $[\text{CO}_{2\text{aq}}]$ ¹⁴.

Here we explore the long-term response of coccolithophore calcification and HCO_3^- allocation to the evolution of ocean conditions and $[\text{CO}_{2\text{aq}}]$ over the past 14 million years (Myr) in a key coccolithophore family, the Noëlaerhabdaceae. This family, which includes the genera *Emiliania*, *Gephyrocapsa*, *Pseudoemiliania* and *Reticulofenestra*, dominates most modern ocean coccolithophore communities as well as fossil assemblages since the Miocene. As an indicator of coccolithophore calcification, we show that coccolith thickness correlates strongly with cellular calcification per unit surface area across the range of modern Noëlaerhabdaceae. We then document changes in the size and degree of calcification of Noëlaerhabdaceae coccoliths since 14 Myr ago in two sediment sequences from the tropical Atlantic and Indian Oceans containing well-preserved coccoliths (Ocean Drilling Program, ODP, Site 925 and Indian National Gas Hydrate Program Site NGHP-01-01A, respectively; Fig. 1). In contrast to recent studies of coccolith mass^{5,15–18}, we present our data as coccolith thickness within narrow size classes to focus on changes in degree of calcification of coccoliths, allowing us to better capture the potential coccolithophore calcification response to changes in the palaeo-carbonate system¹⁹. These records are the first to document past long-term changes in coccolithophore calcification for given cell size classes in the Miocene and Pliocene, when $p\text{CO}_2$ was higher than pre-industrial levels. Using the geochemical signature of coccoliths, we then assess if changes in degree of calcification correspond to changes in the allocation of intracellular HCO_3^- resources to calcification. Finally, we evaluate the potential role of changing upper ocean stratification

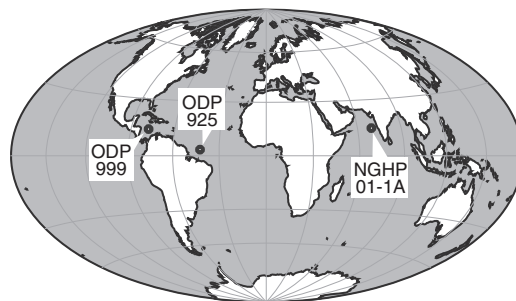


Figure 1 | Map showing site locations.

and $[\text{CO}_{2\text{aq}}]$ on both degree of calcification and HCO_3^- resource allocation, using new proxy records of foraminiferal stable isotopes ($\delta^{18}\text{O}$ and $\delta^{13}\text{C}$) and carbon isotopic fractionation by alkenone-producing haptophyte algae during photosynthesis (ϵ_p).

Results

Coccolith thickness and cellular calcification. New culture experiments sampling the diversity of modern Noëlaerhabdaceae coccolithophores show variation in coccolith thickness both among the different species and among different strains of the same species. This variation in thickness correlates strongly with variation in cellular calcification per surface area as well as with changes in calcite/organic carbon, a measure of calcification per cell volume (Fig. 2 and Supplementary Fig. 1). The thickness of an individual coccolith is intimately linked to the degree of calcification of a cell, because it represents a key mechanism by which cells can regulate the amount of biomineral for a given cell volume. Various factors may drive cells to adjust calcite per cell surface area. In this study, we focus on changes that are occurring within narrow size classes. In addition, calcite per cell surface area varies with cell size across the modern diversity of placolith-bearing coccolithophores, where small cells are characterized by thinner coccoliths (Supplementary Fig. 2). This latter effect may be an adaptation to compensate for the higher surface area to volume ratio of small cells that, if calcification per cell surface area were constant across all cell sizes, would impose a much higher biomineral requirement relative to cell volume in small cells. While coccolith mass has been used as an indicator of cellular calcification in Pleistocene and recent sediments^{15–18}, coccolith mass is driven by changes in cell size as well as degree of calcification. On the other hand, coccolith thickness within narrow size classes, or size-normalized coccolith thickness, represent degree of calcification and are indicators better suited to reconstructing coccolithophore calcification on long timescales over which significant coccolith and cell size changes occur. The range of coccolith thickness variation among cultured Noëlaerhabdaceae strains (Fig. 2) is consistent with previous observations that phenotypic differences in the degree of calcification between species and between strains of the same species tend to be much larger than the phenotypic plasticity of a single strain cultured under varying environmental conditions^{8,9,20}. This may arise if coccolith morphology or thickness is genetically regulated⁹. The potential for large intraspecific diversity may reflect the genetic architecture, in that the dominant modern Noëlaerhabdaceae *Emiliania huxleyi* has a pan-genome composed of core genes plus genes distributed variably amongst strains²¹.

Decreasing cellular calcification since the late Miocene. Over the past 14 Myr, the Noëlaerhabdaceae have undergone large variations in coccolith size (Fig. 3) and degree of calcification, represented by thickness (Fig. 4). Changes in coccolith thickness

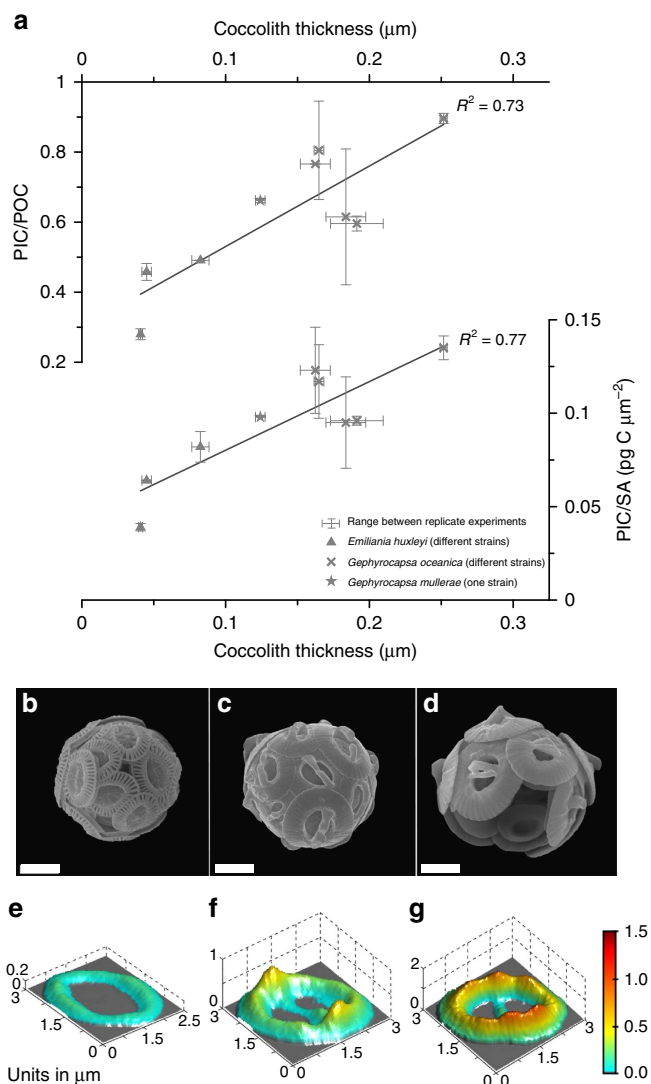


Figure 2 | Noëlaerhabdaceae coccolith morphology in culture.

(a) Relationship between coccolith thickness and cellular PIC/POC (particulate inorganic carbon/particulate organic carbon) and cellular PIC/cell SA (surface area) for modern strains of *Emilia huxleyi* and *Gephyrocapsa* grown in laboratory culture (Supplementary Table 1). Symbols are averages for each experiment and lines show the range of values between replicate culture bottles for each experiment. Scanning electron microscope images of coccospheres for the strains with lowest (RCC 1257, **b**), intermediate (RCC 3370, **c**) and highest (RCC 1292, **d**) coccolith thickness. Scale bar, 2 μm (in all images). (**e–g**) Three-dimensional representations of coccolith thickness for the same strains as coccospheres. The vertical scale shows cumulative thickness from zero at the base; therefore in the central area of *Gephyrocapsa* coccoliths, the bridge (central area bar) is displaced towards the base of the plane of illustration.

are evident in both narrowly restricted size classes, as well as in measurements of size-normalized (SN) thickness and calculated ‘shape factor’, confirming that they are not a direct result of temporal changes in coccolith and cell size (isometric scaling, that is, changes related to proportional changes in size) (Fig. 4). The quantification of thickness was not biased by variable coccolith fragmentation (Supplementary Fig. 3). Scanning electron microscope (SEM) observations confirm that in all samples the original crystal structure of the coccolith remains well defined. Only on some older coccoliths did we identify a small amount of diagenetic overgrowth (small abiogenic crystals formed on the

surface of the collar in the central area; Supplementary Data 1) However, the presence of this minor overgrowth does not correspond to an increase in coccolith thickness, except in the oldest 14 Myr old sample at the Indian Ocean Site. Thus, with this exception, the preservation visible under SEM makes it unlikely that middle Miocene Noëlaerhabdaceae coccoliths of a given size were originally thinner and more delicate than those present in our samples. This suggests that either (1) overgrowth was minor enough not to significantly impact mean coccolith thickness, or (2) the calcite that recrystallized on the surface of coccoliths was originally derived from dissolution of primary calcite of these same coccoliths. Between 8 and 3 Myr ago at both sites, *Spencolithus* and *Discoaster* nannoliths are abundant. These are typically more susceptible than placolith coccoliths to overgrowth due to their crystal structure, yet SEM images show that these susceptible forms exhibit excellent and constant preservation, providing supporting evidence that diagenetic overgrowth was not more significant when Noëlaerhabdaceae coccoliths showed a higher degree of calcification at 6–8 Myr ago relative to at 3–4 Myr ago (Supplementary Data 1; Supplementary Figs 4 and 5).

The measured coccolith populations exhibit large variability in the morphology and degree of calcification of small coccoliths within and between each sample (Fig. 4; Supplementary Figs 4 and 5; Supplementary Data 1). For example, *Gephyrocapsa protohuxleyi*, a form close to *E. huxleyi* but with a central area bridge characteristic of *Gephyrocapsa*, was present in Pleistocene samples at both sites alongside much more heavily calcified *Gephyrocapsa* coccoliths. Despite this large diversity in morphology and thickness, there are significant changes in the dominance of more heavily calcified versus more lightly calcified forms over time, as well as the emergence during the early Pliocene of coccoliths thinner and/or with larger central area openings than those found in previous intervals. Coccolith degree of calcification was on average highest between 14 and 6 Myr ago and decreased abruptly in the late Miocene to early Pliocene (6–4 Myr ago) to low values that were maintained during the Pliocene and early Pleistocene (4–1 Myr ago). For the few sample points of the last 1 Myr ago, degree of calcification increased both in the Indian and Atlantic Ocean records relative to this Pliocene minimum (Fig. 4). However, we note that assemblages in our samples <1 Myr ago are dominated by *Gephyrocapsa* coccoliths and pre-date the emergence of the less heavily calcified *E. huxleyi* (see k_s values, Fig. 4d,h), which is significant especially in modern high and mid-latitude regions. Large changes in degree of coccolith calcification, including the decrease from 6 to 4 Myr ago and the increase around 1 Myr ago at both sites, occurred within the dominant genus at a given time, and do not coincide with major shifts in the contribution of different genera to the Noëlaerhabdaceae (Fig. 4).

Late Miocene changes in cellular HCO_3^- allocation.

Geochemical records of carbon isotopic fractionation into coccolith calcite ($\epsilon_{\text{coccolith}}$) can be used to elucidate the relationship between the observed changes in degree of calcification and the resource allocation of carbon to calcification. Models of cellular carbon fluxes have shown that $\epsilon_{\text{coccolith}}$ becomes increasingly depleted if the rate of supply of HCO_3^- to the site of calcification (coccolith vesicle) is reduced relative to calcification rate¹⁴. Our new records of $\epsilon_{\text{coccolith}}$ from ODP Site 925 show that large cells begin to decrease the HCO_3^- allocation to calcification at about 8 Myr ago, evidenced by decreasing $\epsilon_{\text{coccolith}}$ (Fig. 5a,b). This trend occurs shortly after a decrease in mean Noëlaerhabdaceae coccolith size (interpreted as a reduction in mean cell size¹³) at both sites (Fig. 3) that is also observed in other low-latitude records^{12,22,23}. Reduced HCO_3^- allocation to

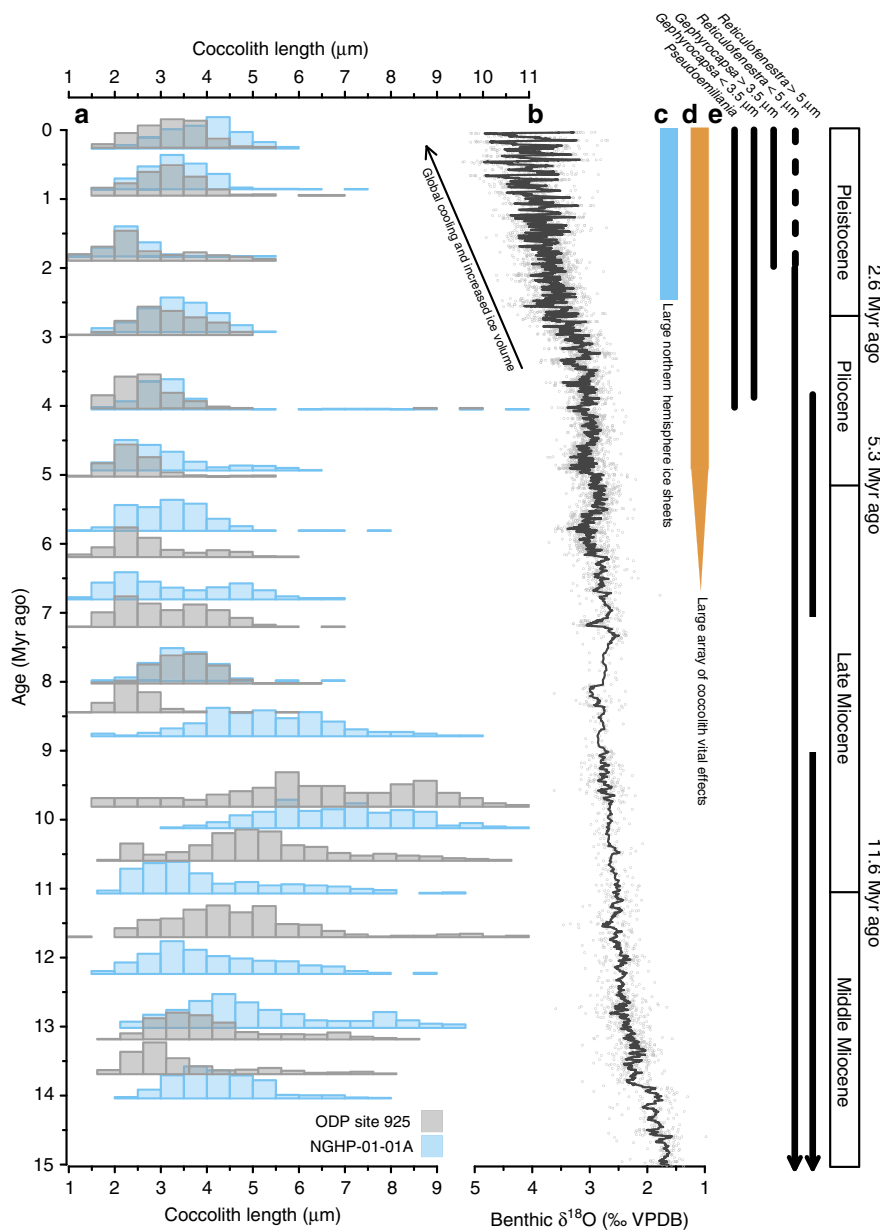


Figure 3 | Long-term evolution of Noëlaerhabdaceae coccolith size and stable isotope vital effects with climate over the last 14 Myr.

(a) Noëlaerhabdaceae coccolith size distributions over time at Sites ODP 925 (grey) and NGHP-01-01A (blue). (b) Climate evolution over the Neogene represented by a benthic foraminiferal $\delta^{18}\text{O}$ stack (data compiled by ref. 86). (c) Onset of major northern hemisphere glaciation at ~2.6 Myr ago. (d) The emergence of large scale vital effects in the $\delta^{18}\text{O}$ and $\delta^{13}\text{C}$ of coccolith calcite around 7–5 Myr ago (ref. 14; this study). (e) Approximate age ranges of Neogene genera belonging to the Noëlaerhabdaceae family⁷⁶.

calcification continues in large cells from 6 to 4 Myr ago, as indicated by decreasing $\epsilon_{\text{coccolith}}$ during this interval, despite a stable trend in mean coccolith size. Although we cannot resolve changes in the degree of calcification of large coccoliths in this study (see Methods), the $\epsilon_{\text{coccolith}}$ trend suggests that in large cells, the change in HCO_3^- allocation to calcification was of greater magnitude than any concurrent decrease in calcification that may have occurred. This significant reduced allocation to calcification in large cells drove a divergence in the range of vital effects among small and large coccoliths after 8 Myr ago (Fig. 5a), similar to the results from Caribbean ODP Site 999 (ref. 14).

Small coccoliths show evidence for decreased HCO_3^- allocation to calcification only since 6 Myr ago. From 11 to 6 Myr ago, $\epsilon_{\text{coccolith}}$ and SN coccolith thickness are relatively stable (Fig. 5b,c), suggesting minimal changes in HCO_3^-

allocation to calcification. In contrast, between 6 and 1 Myr ago, a near-constant $\epsilon_{\text{coccolith}}$ indicates a stable ratio of HCO_3^- allocation to the coccolith vesicle relative to calcification rate, despite a large decrease in degree of calcification (Figs 4 and 5c). This implies a decrease in HCO_3^- allocation to calcification of comparable magnitude to the decrease in cellular calcification. In the last 1 Myr, an increase in degree of calcification in the small coccoliths with no change in $\epsilon_{\text{coccolith}}$ suggests that allocation of HCO_3^- to calcification also increased in parallel.

Relationship between calcification and ocean stratification.

Water column stratification influences productivity and production depth in the tropics. Stratification can be inferred from foraminiferal $\delta^{18}\text{O}$ gradients between the upper mixed

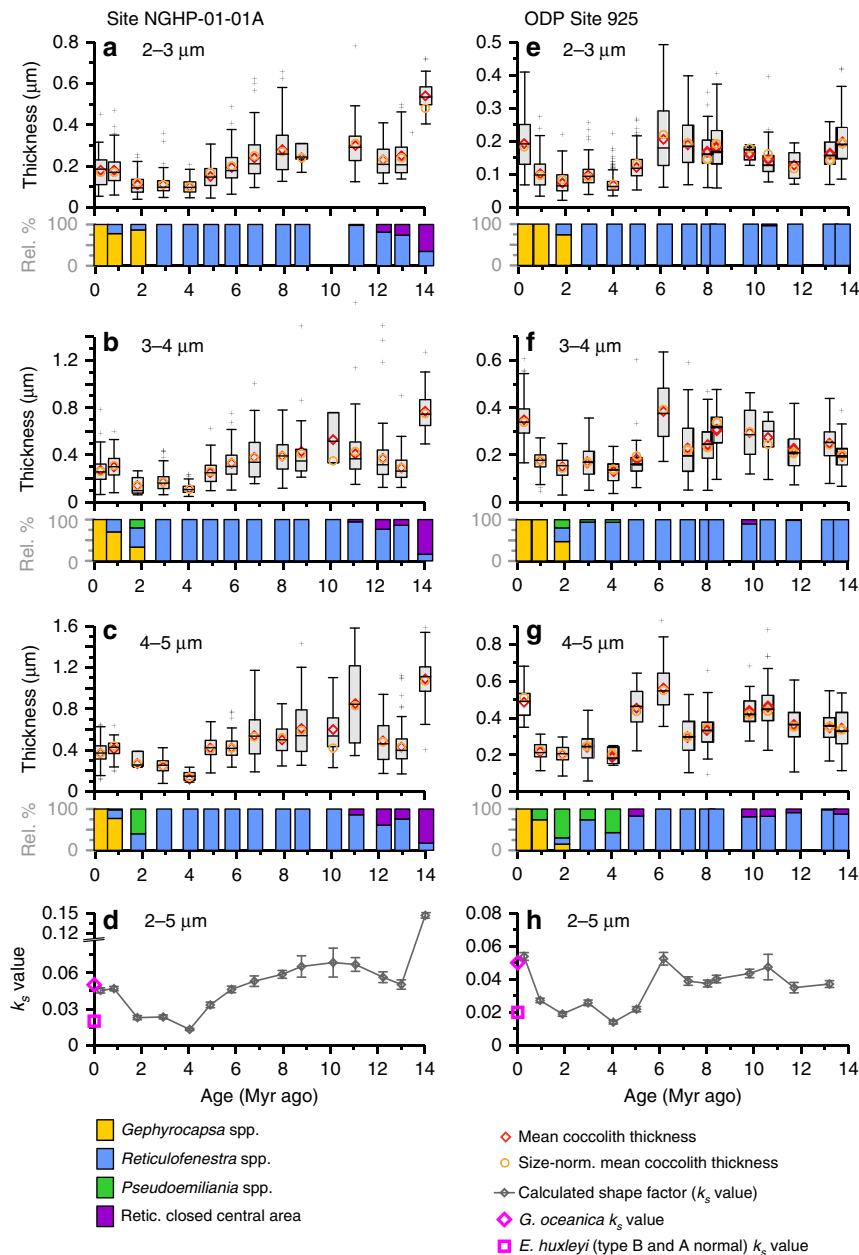


Figure 4 | Changes in Noëlaerhabdaceae coccolith thickness and k_s value at two tropical sites since 14 Myr ago. (a-d) Site NGHP-01-01A, and **(e-h)** ODP Site 925. **(a-c, e-g)** Thickness data for coccoliths of 2–3, 3–4 and 4–5 μm length. Box-Whisker plots illustrate coccolith thickness data for each sample and size class (box shows median value and upper/lower quartiles, whiskers show maximum and minimum values, outliers $>1.5 \times$ the interquartile range are shown as crosses). Also shown are mean values of raw (circles) and SN (diamonds) thickness (Supplementary Data 1). Bar graphs show the relative contribution of different genera to the Noëlaerhabdaceae population in each size class and sample. **(d, h)** k_s values (error bars are ± 2 s.e.m.). The shape factor k_s , which expresses the fraction of the volume of a cube defined by the length of a coccolith that is composed of biomineral⁷⁷, was originally proposed to estimate coccolith mass from coccolith length and is similar to coccolith thickness. However, unlike thickness, k_s does not account for variations in coccolith circularity. Pink symbols are k_s for extant Noëlaerhabdaceae species⁷⁷.

layer (*Globigerinoides sacculifer*) and thermocline (*Globorotalia menardii*), because these reflect the upper photic zone temperature and salinity gradients²⁴. The temporal evolution of planktic foraminiferal $\delta^{18}\text{O}$ at Sites ODP 925 and NGHP-01-01A is shown in Fig. 6. Between 3.5 and 2 Myr ago, a deep thermocline at Site 925 is inferred from independent foraminiferal assemblage indicators²⁵, potentially suggesting a deeper coccolithophore depth habitat and lower light levels. Decreased light has been shown to reduce cellular calcification (PIC/SA) twofold by a reduction in photon flux density from 80 to 15 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ in culture²⁶, and low light levels have been

proposed to decrease cellular HCO_3^- transport²⁷. However, neither site shows a clear decrease in $\delta^{18}\text{O}$ gradients at this time (Fig. 6a,b), as would be expected if reduced coccolith calcification from 4 to 1 Myr ago were due to a deepening of the thermocline, resulting in a reduced temperature gradient between the two foraminifer species' depth habitats. Proxy records suggest high productivity from 10 to 8 Myr ago in the Indian Ocean²⁸ and from 6.6 to 6 Myr ago at ODP Site 925 (ref. 29). Thus, reconstructed changes in water column structure and paleoproductivity do not consistently co-vary with changes in degree of coccolith calcification.

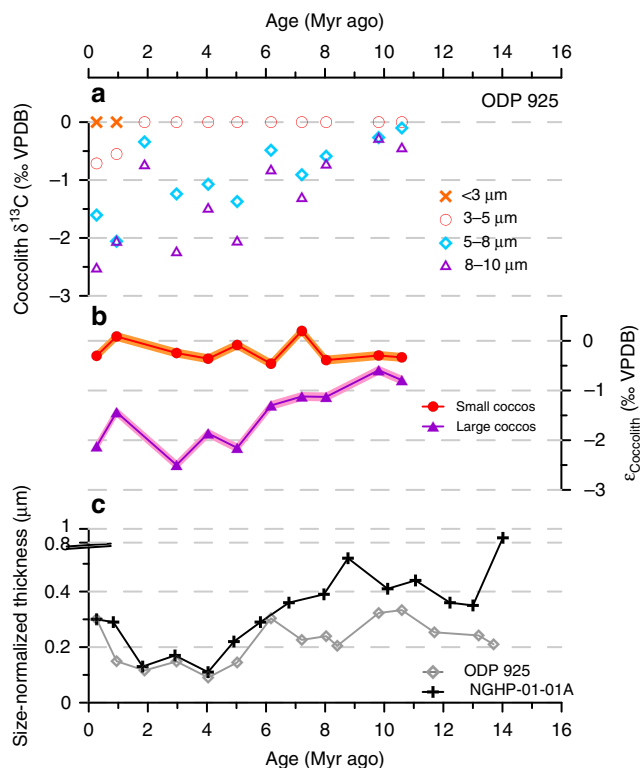


Figure 5 | Coccolith geochemistry and SN thickness trends since the Miocene. (a) $\delta^{13}\text{C}$ values for size-separated coccoliths from ODP Site 925, normalized to the smallest coccolith size fraction. (b) $\epsilon_{\text{coccolith}}$ for small (3–5 μm) and large (8–10 μm) coccoliths from Site 925. Shading indicates propagated analytical uncertainty on $\delta^{13}\text{C}$ measurements. (c) mean SN coccolith thickness for Noëlaerhabdaceae coccoliths of 2–5 μm lengths at ODP Site 925 and Site NGHP-01-01A (coccolith thicknesses are normalized to mean coccolith length within the 2–5- μm size fraction over the whole time series at each site, that is, 3.52 and 3.93 μm , respectively).

Calcification and $[\text{CO}_{2\text{aq}}]$ in the Miocene–Pliocene. Carbon isotopic fractionation in phytoplankton during photosynthesis (ϵ_p) varies directly with $[\text{CO}_{2\text{aq}}]$ and has been widely applied as a CO_2 proxy in the Cenozoic. However, limited data exist for the interval of major changes in calcification and HCO_3^- allocation between 14 and 5 Myr ago. In addition, the interpretation of any data is complex because of the expected influence of active HCO_3^- allocation on ϵ_p (ref. 14). Our new record of ϵ_p extends the published record from ODP Site 999 for the last 5 Myr³⁰ back to 16 Myr ago (Fig. 7a). This extended record reveals a decrease in ϵ_p from 16 to 8 Myr ago, an excursion to higher ϵ_p values at 7 Myr ago, and then a continued decrease towards the present. The decline in ϵ_p could be driven by decreasing $[\text{CO}_{2\text{aq}}]$, increasing cellular growth rates that increase carbon demand relative to supply, or increasing cell sizes that reduce surface area to volume and thus diffusive supply (see ref. 31 and references therein). Following previous workers, $[\text{CO}_{2\text{aq}}]$ is estimated with the formula $[\text{CO}_{2\text{aq}}] = b/(\epsilon_f - \epsilon_p)$, where ϵ_f is a constant reflecting the maximum effective photosynthetic fractionation by the cell (25‰), and ‘ b ’ encompasses factors such as growth rate and cell geometry that modulate the ratio of carbon supply to demand by the cell. First, to estimate temporal variations in b due to cell size, we use previous formulations of the relationship between cell size and b ³², together with our record of tropical Noëlaerhabdaceae coccolith size evolution (Fig. 7b), which shows trends similar to those at other tropical sites^{22,23}. The decrease in cell size after 9 Myr ago, compared with the average between 11 and 16 Myr ago, corresponds to a 25% reduction in the b value. Second, we estimate the influence of productivity on b using proxy records from ODP Site 999 of coccolith Sr/Ca and alkenone mass accumulation rates (Fig. 7c). These records confirm that there is no long-term productivity increase, and suggest maxima from 13 to 10 Myr ago and at 8 Myr ago. Calculated b values are shown in Fig. 7d. The resulting estimates of $[\text{CO}_{2\text{aq}}]$ (Fig. 7e) show a trend of continued decline over the past 16 Myr, with the exception of a local maximum at 9.3–10.3 Myr ago resulting from the unusually large cell sizes in

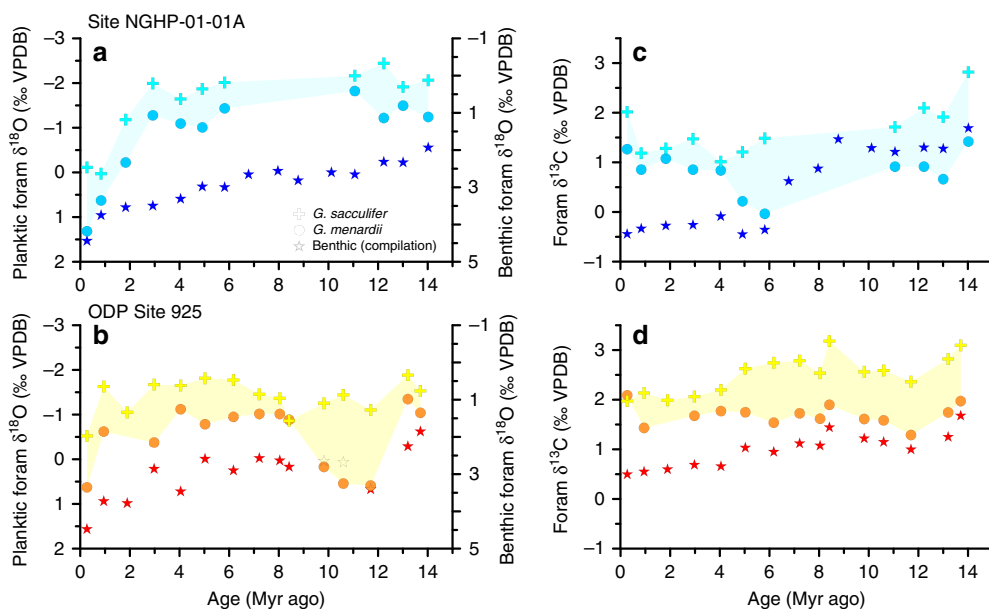


Figure 6 | Foraminiferal stable isotope records as indicators of water column structure. $\delta^{18}\text{O}$ (a,b) and $\delta^{13}\text{C}$ (c,d) records for surface (*G. sacculifer*), thermocline (*G. menardii*) and benthic species at Sites ODP 925 and NGHP-01-01A. Benthic isotope data for our sites are not available, therefore values were interpolated using a global compilation³⁶ separated into ocean basins. Because Neogene Indian Ocean data are sparse and trends are very similar to those in the Pacific, a compilation of Indian and Pacific Ocean data were used to interpolate the benthic values in a and c. For b and d, a compilation of all Atlantic data was used. Note: benthic $\delta^{18}\text{O}$ is plotted on a different y axis. Shading indicates the gradient between surface and thermocline-dwelling planktic foraminiferal species.

the geometry correction. Assuming equilibrium with the atmosphere, these results are similar in trend and magnitude to $[\text{CO}_{2\text{aq}}]$ predicted from the atmospheric $p\text{CO}_2$ curve of ref. 33 derived from inverse modelling of climate data (Fig. 7e). The absolute values of $[\text{CO}_{2\text{aq}}]$ are subject to greater uncertainty than the trend.

As in previous studies³⁰, our calculations would not account for the likely increase in active carbon uptake for photosynthesis as $[\text{CO}_{2\text{aq}}]$ declined^{14,34}, especially after 8 Myr ago. Because active carbon transport increases the chloroplast uptake of inorganic carbon relative to fixation, it can result in higher ε_p values than would be predicted from passive diffusive CO_2 uptake alone³⁵.

Laboratory culture experiments suggest that active HCO_3^- transport to the chloroplast becomes more significant at low $[\text{CO}_{2\text{aq}}]$. Simulations with the ACTI-CO model of HCO_3^- transport in coccolithophores¹⁴ were used to evaluate the potential impact of changes in active carbon uptake on ε_p and calculated $[\text{CO}_{2\text{aq}}]$ (Supplementary Methods; Fig. 8). In one set of simulations, we specify a logarithmic dependence of chloroplast HCO_3^- transport/diffusive CO_2 uptake on $[\text{CO}_{2\text{aq}}]$ as observed in culture experiments^{14,27}. Alternatively, if enhancement of HCO_3^- transport to the chloroplast is coupled, in part, to reallocation of HCO_3^- from the coccolith vesicle, as inferred from modelling of cultures¹⁴, our new $\varepsilon_{\text{coccolith}}$ and SN coccolith thickness data put additional constraints on the timing of this reallocation. Therefore in a second set of simulations, we specify chloroplast HCO_3^- transport based on HCO_3^- spared from the coccolith vesicle by the reduction in cellular calcite in the last 8 Myr. We then derive the $[\text{CO}_{2\text{aq}}]$ implied by measured ε_p for the specified parameterization of active HCO_3^- uptake to the chloroplast. The results in both cases indicate a greater amplitude of decline in $[\text{CO}_{2\text{aq}}]$ compared with that reconstructed with standard cell size and growth rate considerations only, from around 17 to 6 μM (Fig. 8).

Calcification in relation to CO_2 and alkalinity since 1 Myr ago. In the last 1 Myr, climate, the carbon cycle and ocean chemistry

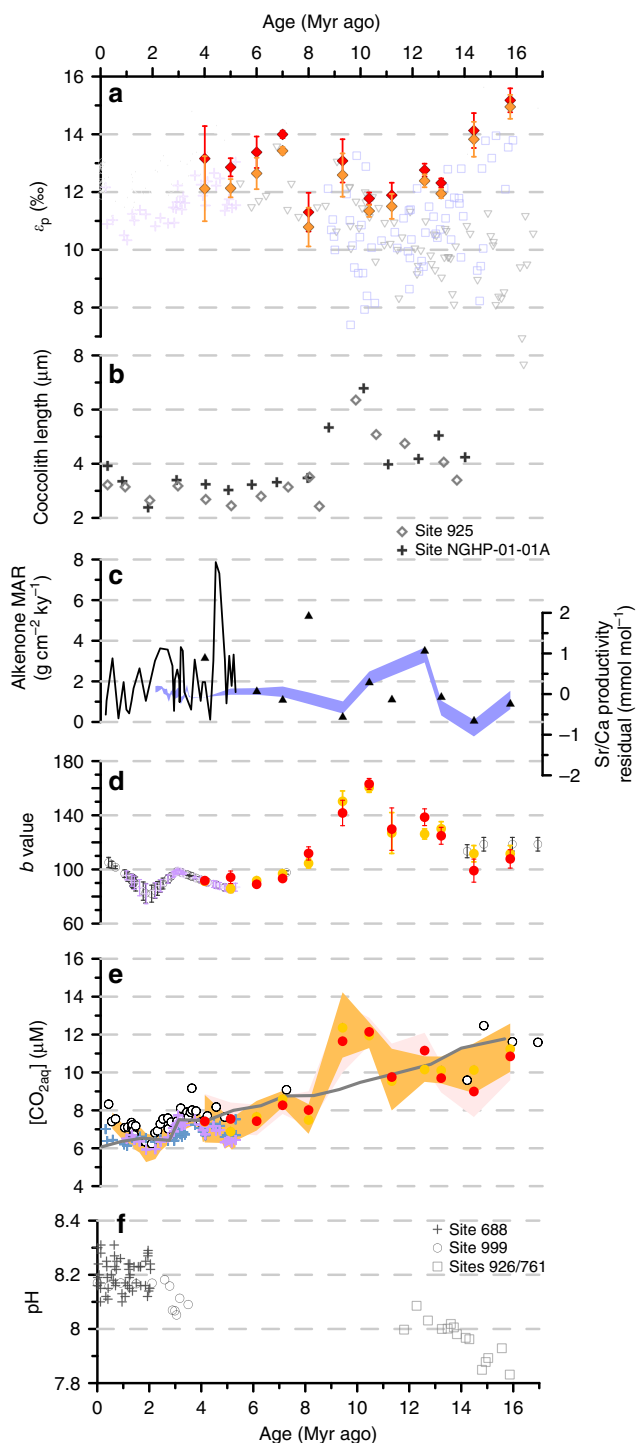


Figure 7 | ε_p values and estimates of b and $[\text{CO}_{2\text{aq}}]$ at Caribbean ODP Site 999 and other sites for the last 17 Myr.

(a) New ε_p data (Site 999, red diamonds: SST max, orange diamonds: SST min; error bars show propagated analytical uncertainty on $\delta^{13}\text{C}$ measurements). Published ε_p records: Site 999 (ref. 30) (purple crosses), ODP Site 925 (ref. 37) (grey circles), DSDP Sites 588 (ref. 84) (grey triangles, maximum ε_p) and 608 (ref. 84) (blue squares). (d) Variations in b (Site 999) inferred to arise from changing cell size (b) and growth rate (c) (see Methods). In c, triangles (this study) and line³⁰ show alkenone MARs and blue shading shows Sr/Ca productivity estimates for small coccolithophores¹⁴ (all Site 999). In d, purple crosses (Site 999 (ref. 30)), grey circles (Site 925 (ref. 37)), and orange circles (Site 999, this study) show b values recalculated using our new cell size correction. Red circles (Site 999, this study) show b values calculated with cell size and growth rate corrections. For error calculations, see Methods. (e) $[\text{CO}_{2\text{aq}}]$ calculated using cell size (orange circles), or cell size plus growth rate (red circles), correction and ε_p values (Site 999, this study). $[\text{CO}_{2\text{aq}}]$ was also recalculated using our cell size correction for the Plio-Pleistocene at Site 999 (ref. 30) (purple crosses) and Site 925 (ref. 37) (grey circles). For all sites, reference $b = 150$. $[\text{CO}_{2\text{aq}}]$ assuming constant b for Site 999 (ref. 30) is also shown (blue crosses). Shading indicates maximum and minimum $[\text{CO}_{2\text{aq}}]$ estimates for all data from Site 999 (see Supplementary Methods). We do not apply our size correction to DSDP Sites 608 and 588 ε_p data because these sites are at significantly higher latitudes; therefore cell size history may be different compared with the tropical sites studied here. Also shown in e is the $[\text{CO}_{2\text{aq}}]$ expected for the Caribbean site if it were in equilibrium with the atmospheric $p\text{CO}_2$ modelled by ref. 33 (grey line). (f) pH derived from $\delta^{11}\text{B}$ of planktic foraminifers, for the Plio-Pleistocene^{30,36} and Miocene⁵³. During the Miocene, ODP Site 999 ε_p values are similar to values at ODP Site 925 (ref. 37) and higher than values from DSDP Sites 588 and 608 (ref. 85). From 16 to 9 Myr ago, the maximum ε_p at DSDP Site 608 shows a similar trend to ε_p at ODP Site 999, albeit with slightly lower absolute values, suggesting that either both sites experienced similar changes in growth rates, or that a global CO_2 component exerted a dominant forcing on both ε_p records. The temporally variable scatter to low ε_p values seen in the Site 608 record may result from higher frequency oscillations in growth rates at this site⁸³. The much lower average ε_p at Site 588 suggest that this site experienced on average higher phytoplankton growth rates and productivity compared to Sites 925, 999 and 608.

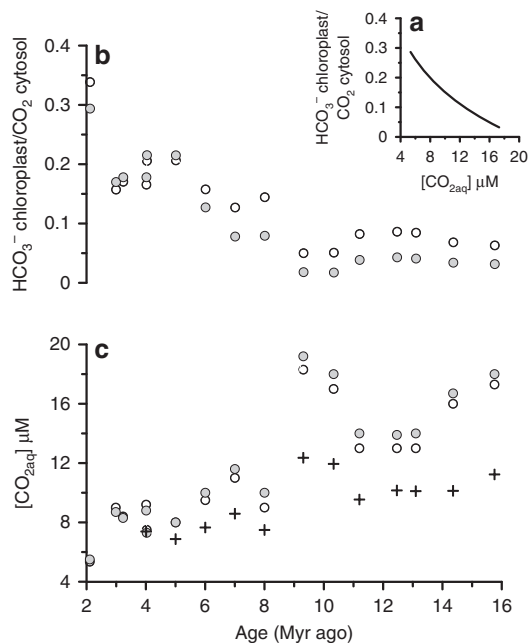


Figure 8 | Simulations of the effect of active HCO_3^- uptake on reconstructed $[\text{CO}_{2\text{aq}}]$. ACTI-CO model simulation for two potential scenarios of active HCO_3^- uptake to the chloroplast (**b**), and consequences for $[\text{CO}_{2\text{aq}}]$ implied by alkenone ε_p measurements (**c**). A first simulation (unfilled circles) employs a logarithmic dependence of HCO_3^- transport to the chloroplast on $[\text{CO}_{2\text{aq}}]$, similar to that observed in cultures (**a**). A second simulation (filled circles) supplements HCO_3^- supply to the chloroplast as a function of HCO_3^- spared from the coccolith vesicle by the production of thinner coccoliths (that is, a reduced PIC per cell surface area). Crosses in **c** show $[\text{CO}_{2\text{aq}}]$ estimated from standard regressions between ε_p and $[\text{CO}_{2\text{aq}}]$ as shown in Fig. 7e (orange circles).

underwent significantly higher amplitude variations on glacial–interglacial timescales compared with the preceding 15 Myr. Although our sampling resolution does not capture this higher frequency variability, and does not sample very recent major evolutionary events such as the emergence of *E. huxleyi*, our results nonetheless suggest in the Pleistocene a reversal of the late Miocene–Pliocene trend of more lightly calcified coccoliths and decreasing HCO_3^- allocation to the coccolith vesicle. Within the last 1 Myr, both of these factors rebound to values typical of the late Miocene (Fig. 5). Records based on boron isotopes³⁶, alkenone $\delta^{13}\text{C}$ (refs 30,37), and ice cores³⁸ suggest $p\text{CO}_2$ values below around 280 p.p.m. over the last 2 Myr, so this increase in degree of calcification contrasts with the generally positive correlation of $[\text{CO}_{2\text{aq}}]$ and degree of calcification observed over the preceding interval.

The change in relationship between degree of coccolith calcification and $[\text{CO}_{2\text{aq}}]$ is even more salient when we examine which samples fall in glacial or interglacial ocean states. Planktic foraminiferal $\delta^{18}\text{O}$ values from samples at Indian Ocean Site NGHP-01-01A and the orbital age model for Atlantic ODP Site 925 indicate that our youngest samples at both sites (about 0.27 Myr ago), with high SN coccolith thickness, coincide with glacial periods (Supplementary Fig. 6). The sample at 0.84 Myr ago from Site NGHP-01-01A with high SN coccolith thickness also falls during a glacial period, whereas the sample at 0.95 Myr ago from the Site 925, with lower SN coccolith thickness, falls in an interglacial. These particular sampling points therefore underscore the nature of a change in the relationship between degree of calcification and $p\text{CO}_2$, as the samples with thicker coccoliths in a

given size class are from glacial periods that coincide with $p\text{CO}_2$ minima in the last 800 kyr (Supplementary Fig. 6).

In the absence of a coherent relationship with $[\text{CO}_{2\text{aq}}]$, we consider whether a change in ocean alkalinity may have increased cellular HCO_3^- uptake and reduced competition for intracellular HCO_3^- , promoting the recovery of degree of coccolith calcification and HCO_3^- allocation to calcification. No proxy record of alkalinity change has yet been produced for this time interval. Multiple lines of evidence based on geochemistry, sedimentology and modelling suggest that the rate of silicate weathering, which adds alkalinity to the ocean, accelerated around 1.5 Myr ago as the North American Precambrian basement shed regolith and experienced more intense subglacial erosion³⁹. At the same time the first large amplitude sea level cycles accelerated erosion of shelf sediments⁴⁰. Estimates of alkalinity from carbon system proxies are subject to multiple uncertainties. To explore the magnitude of alkalinity change that might be possible, we compared pH estimates from boron isotopes in planktic foraminifers with estimates of ocean $[\text{CO}_{2\text{aq}}]$ calculated from the cycles of atmospheric $p\text{CO}_2$ recorded in ice cores. While not diagnostic, this analysis suggests the potential for an increase in alkalinity by up to 30% during successive glacials of the last 1.5 Myr (Supplementary Methods; Supplementary Fig. 6). Such an increase would contrast with relatively stable alkalinity inferred for the previous 14 Myr from analysis of the carbonate compensation depth⁴¹, although such estimates are also subject to multiple uncertainties (Supplementary Fig. 7).

Discussion

Over the past 14 Myr, selective pressure has acted on the large diversity of different degrees of calcification and morphotypes found in natural coccolithophore populations^{15,42–46}, modifying in a similar way in the tropical Atlantic and Indian Oceans the composition of the population towards better-adapted forms. A similar selective pressure has been suggested for natural populations on seasonal timescales, modulating the relative contribution of different *E. huxleyi* morphotypes with specific degrees of calcification⁴⁶. Long-term mono- and multi-clonal experiments also reveal genotypic selection, as well as beneficial new mutations, as a mechanism for adaptive evolution¹¹. Such coccolithophore species or morphotype shifts as a result of ocean changes in the future will arguably have a greater impact on carbon cycle feedbacks than direct physiological responses, highlighting the importance of studying integrated community calcification as well as species- or clone-specific responses^{47,48}.

The similar long-term decreases in degree of coccolith calcification at our Atlantic and Indian Ocean sites suggest a common selective pressure. This trend in calcification occurs alongside reduced HCO_3^- allocation to the coccolith vesicle. The lack of a coherent relationship between stratification and productivity and SN coccolith thickness at both sites suggest that these factors are not strong candidates to force the common trends in degree of calcification at both sites. In contrast, while the relationship between $[\text{CO}_{2\text{aq}}]$ and cellular calcification has been ambiguous in clonal cell cultures^{49–51}, decreasing $[\text{CO}_{2\text{aq}}]$ is one factor shown to reduce HCO_3^- allocation to calcification in modern cells¹⁴. Changes in $[\text{CO}_{2\text{aq}}]$ are expected to be globally synchronous across the stratified tropical oceans. While the magnitude of $[\text{CO}_{2\text{aq}}]$ decline is sensitive to the inferences about active carbon uptake by algae and detailed steps in $[\text{CO}_{2\text{aq}}]$ cannot be reliably identified given the resolution of our record, a progressive $[\text{CO}_{2\text{aq}}]$ decline since the middle Miocene is evident and correlates with a succession of adaptations in coccolithophore calcification and cell size. A decline in cell size and the first evidence for reduced allocation of HCO_3^- to calcification

(decreasing $\epsilon_{\text{coccolith}}$) in the larger coccolithophores occurs several million years before the reduced allocation of HCO_3^- to calcification and reduced cellular calcification in small cells.

The factors driving this differential timing and type of response between the smaller and larger coccolithophores are at this time uncertain but might include lesser plasticity of coccolith thickness in larger genera (*Helicosphaera*, *Coccolithus* and *Calcidiscus*), or a much stronger pressure for HCO_3^- reallocation by larger cells whose diffusive CO_2 supply was more limited by their low surface area to volume ratio. While decreasing coccolith size has been suggested as one adaptation to decreasing CO_2 availability^{12,52}, changes in coccolith size, like changes in degree of calcification or changes in the allocation of available carbon to calcification, appear to be part of an array of possible adaptations that may be used simultaneously or sequentially. These strategies appear to be used to varying degrees in different cell size classes, potentially with different thresholds, as each adaptation may come with its own trade-offs. In addition to varying resource availability documented by geochemical indicators, 'top down' ecological pressures may contribute to changes in coccolithophore calcification, but unfortunately no proxies are yet available to evaluate their significance in the geological past.

Here, we show a new approach to exploiting independent geochemical and morphological records of coccolithophores to explore the effect of changing cellular HCO_3^- allocation on the magnitude of $[\text{CO}_{2\text{aq}}]$ change inferred from ϵ_p . This approach significantly increases the magnitude of inferred $[\text{CO}_{2\text{aq}}]$ decline over the last 16 Myr, a result that if substantiated by future high-resolution work, would have important implications for our understanding of climate sensitivity.

The coincidence of greatest SN coccolith thickness and inferred degree of cell-calcification with the period of highest $[\text{CO}_{2\text{aq}}]$ in the Miocene is at odds with hypotheses for less-calcified cells under future ocean acidification^{15,20,48}. Similar to future scenarios, proxy records of past pH derived from boron isotopes in planktic foraminifer shells suggest that high Miocene $[\text{CO}_{2\text{aq}}]$ coincided with lower surface ocean pH compared with the Pleistocene (Fig. 7f)^{30,53}. Although extracellular pH may influence the ease with which protons produced during calcification are exported from coccolithophore cells⁵⁴, and in some culture experiments low pH reduces cellular Particulate Inorganic Carbon (PIC) to Particulate Organic Carbon (POC) ratio and increases the incidence of coccolith malformation (refs 6,8,55–57 but also see refs 7,58), the limited phenotypic plasticity of short (< 20 generations) monoclonal experiments complicates their extrapolation to real-ocean responses.

Consistent with the long-term responses to high $[\text{CO}_{2\text{aq}}]$ and low pH since the Miocene shown here, a recent study in the Bay of Biscay found a dominance of heavily calcified *E. huxleyi* morphotypes during winter when $[\text{CO}_{2\text{aq}}]$ was highest and pH and CaCO_3 saturation were lowest⁴⁶ (Supplementary Fig. 8). In this study, the low winter calcite saturation state was driven primarily by an increase in dissolved inorganic carbon concentration and, to a minor extent, by reduced temperatures. However, preliminary results for the last 1 Myr suggest that at late Pleistocene $[\text{CO}_{2\text{aq}}]$ levels, increased alkalinity may have favoured a higher degree of cell calcification, consistent with culture experiments at constant $[\text{CO}_2]$, in which increased calcification in *E. huxleyi* accompanied increased alkalinity⁶ (Supplementary Fig. 9). A better understanding of the evolution of ocean alkalinity and $[\text{HCO}_3^-]$ over the last 1.5 Myr as well as higher-resolution coccolith records may help disentangle the interplay of alkalinity and $[\text{CO}_{2\text{aq}}]$ on coccolithophore calcification. In addition, further studies with natural populations are required to establish whether $[\text{CO}_{2\text{aq}}]$ in the modern ocean is a significant driver of cellular calcification.

The long-term reduction in degree of cell-calcification between 14 and 1 Myr ago could potentially have influenced ocean biogeochemical cycles, if a reduction in coccolith ballast lowered the transfer efficiency of organic carbon to the deep ocean. The reduction in cell calcification we identify is coherent with a recent study documenting a global crash in coccolith CaCO_3 burial around 4 Myr ago⁵⁹. One consequence of reduced transfer efficiency would be a shallower mean remineralization depth of organic matter. However, $\delta^{13}\text{C}$ gradients between surface and thermocline-dwelling foraminifers decrease in par with coccolith thickness from 6 to 4 Myr ago, a change driven primarily by the convergence of thermocline $\delta^{13}\text{C}$ values towards surface values (Fig. 6c,d), and suggestive of a deeper depth of organic matter remineralization in the upper water column^{60,61}. This trend suggests that the effect of global cooling, which acts to slow remineralization rates, overrode any effect of reduced ballasting and led to a deepening of mean remineralization depth during the late Miocene⁶⁰. If future global warming likewise leads to a shoaling of mean remineralization depth, it may act to counteract any shift towards enhanced ballasting by more heavily calcified coccolithophore cells.

In summary, our observations suggest that on long timescales, increased $[\text{CO}_{2\text{aq}}]$ and increased alkalinity may contribute selective pressures favouring thicker coccoliths of a given size and a higher degree of cell-calcification. As projected changes in surface ocean chemistry simulate increased $[\text{CO}_{2\text{aq}}]$ but diminished alkalinity, prediction of the sign of calcification will rely on better defining the thresholds of response to each parameter. In addition, it remains to be determined whether coccolithophore responses to rapid ocean chemistry changes in the future will be analogous to the geological-timescale adaptation studied here. The plasticity of coccolith thickness and potential selective pressures in the genetically diverse modern ocean thus warrant further investigation.

Methods

Cellular calcification and thickness in culture. Eight clonal strains of *E. huxleyi* and *Gephyrocapsa* (Supplementary Table 1) were maintained as dilute batch cultures in natural seawater from the Cantabrian Sea (Northern Spain). Prior to experiments, seawater was sterile filtered at 0.2 μm , heated to 80 °C for 3 h, cooled overnight in a sterile hood, and pH was adjusted to 8.3 by addition of NaOH. Media was enriched with major nutrients (P, N), trace metals and vitamins according to the K/2 recipe⁶² modified by eliminating the Tris buffer and silicate. Media was then sterile filtered at 0.2 μm just prior to inoculation. Experiments were carried out under a light:dark cycle of 16:8 h at a constant temperature of 16 °C under saturated light growth conditions (80–150 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ photon flux). A homogeneous distribution of cells was maintained by placing the cultures on a roller system providing gentle rotation during growth. Through serial dilution, cells were maintained in dilute cultures for 8–12 generations before sampling, to establish stable nutrient and carbon chemistry in the media. Each strain was grown in duplicate, and in some cases triplicate, culture bottles. One strain was cultured in two separate experiments and each experiment is reported separately because the two experiments had opposite trends of drift in pH. On collection, media pH and total alkalinity were measured with a Crison GLP-21pH metre calibrated with National Bureau of Standards (NBS) buffers and quadruplicate potentiometric titration of filtered, poisoned media samples on a Crison TitroMatic 1S, respectively^{63,64}. Average media alkalinity was 2,572 $\mu\text{mol kg}^{-1}$ (± 115 , 1 s.d.), pH 8.22 (± 0.07 , 1 s.d.) with drift in pH during experiments of < 0.11 pH units. Cell density was maintained at biomass averaging 1.65 $\mu\text{g C ml}^{-1}$ and in all cases < 2.5 $\mu\text{g C ml}^{-1}$. Cell counts were determined at harvest with a Fuchs–Rosenthal haemocytometer.

For determination of cellular carbon quota, cells were harvested on pre-combusted GF/F or QFF filters. Following acidification to remove calcite, they were analysed for carbon content by flash combustion EA (Euro Vector EA-1108) at 1,020 °C coupled with a Nu Instruments mass-spectrometer (Nu-Horizon). For determination of cellular calcite, cells were harvested on polycarbonate filters. Filters were acidified in 2% HNO_3 and Ca concentration was measured in the resultant solutions by ICP-AES (Thermo ICAP DUO 6300).

Cell size (radius) and cell surface area (SA) were derived from measurements of cellular carbon quota using the regression of Popp *et al.*⁶⁵, which is similar to those derived from other studies^{66,67}. We use PIC/SA as an optimal way to represent calcification across a range of cell sizes, because it is unaffected by the size scaling of

surface area/volume (SA/V). The PIC/POC ratio is often used to describe the degree of calcification per cell, but scales with SA/V, which is dependent on cell size. In published culture studies, at the onset of the photoperiod and just after division, when cell size is smallest and SA/V is highest, the PIC/POC ratio is 30–36% higher whereas PIC normalized to cell surface area is only 10–12% higher⁶⁸. For a given strain of coccolithophore, this inverse correlation between cell size and PIC/POC ratio is widespread in published culture studies (Supplementary Fig. 10) because of the large plasticity of cell size in response to changes in light regime, carbonate system parameters, and temperature. In our culture samples, because of the limited range in cell size, and larger range in coccolith morphology across different strains, both PIC/SA and PIC/POC yield similar results (Supplementary Fig. 1, Supplementary Table 2).

For determination of coccolith mass and thickness, cells were collected on polycarbonate filters. Coccoliths were extracted from the filters by addition of 0.5 ml ethanol with gentle ultrasonication, and evaporation of the ethanol suspension on a glass microscope slide. This ensured that coccoliths were in a single plane of focus for polarized microscopy. A total of 25–55 random fields of view (FOV) were imaged from microscope slides using a Nikon DS-Fi1 8-bit colour digital camera, Nis-Elements software and a Nikon Eclipse LV100 POL polarized light microscope equipped with a $\times 100$ H/N2 objective set-up with circular polarization at Salamanca University (resultant area of one pixel = $0.035 \mu\text{m}^2$). For full details of the circular polarization microscope set-up applied in this study, see ref. 69. The measurement of coccolith thickness from birefringence relies on the systematic relationship between the thickness of a calcite particle and the interference colour that it displays under polarized light^{69–71}. In the thickness range 0–1.55 μm , calcite particles show first-order polarization colours ranging from black to white. Calcite particles thicker than 1.55 μm display first-order polarization colours ranging from yellow through to pink up to a thickness of 4.5 μm , beyond which second-order colours are observed⁷¹. For culture samples, we use a calibration based on a calcite wedge of known thickness to convert grey level to thickness. Images were processed with C-Calci⁶⁹. All coccoliths were analysed with a minimum of 100 per sample, and coccolith length, width and area were measured.

Sites and age models. Fifteen samples spanning the last 14 Myr ago were selected from two low-latitude sites to investigate the evolution of coccolith calcification: ODP Site 925 in the western tropical Atlantic Ocean ($4^{\circ}12.248' \text{ N}$, $43^{\circ}29.349' \text{ W}$, water depth 2041 m) and Site NGHP-01-01A in the eastern Arabian Sea (Kerala–Konkan Basin, $15^{\circ}18.366' \text{ N}$, $070^{\circ} 54.192' \text{ E}$, water depth 2663 m; Fig. 1). Late Neogene sedimentary sections at both sites are primarily calcareous ooze, and sites were selected on the basis of their good coccolith preservation. The age model for Site NGHP-01-01A is based on calcareous nannofossil biostratigraphy⁷², and ODP Site 925 ages are based on astronomical calibration of shipboard physical property data (ref. 73; S.J. Crowhurst and H. Pälike, personal communication, 2013).

Coccolith mass and size measurements in sediments. Microscope slides for image analysis were prepared using a quantitative decantation method producing a homogenous distribution of coccoliths⁷⁴. A total of 20–50 random FOV were imaged as described above for cultures. Microscope light settings and camera parameters were kept constant during each imaging session, and calibration images of the same set of calcite particles (the same *Rhabdosphaera* coccoliths in our youngest ODP Site 925 Pleistocene sample) were taken at the start of each session to account for bulb ageing and the different light requirements for different sample groups. Because the method applied here uses grey scale images to estimate coccolith thickness, it is only applicable to coccoliths thinner than 1.55 μm . In the late Miocene, some large Noëlaerhabdaceae coccoliths display yellow or orange first-order interference colours. For this reason, although size data are presented for all Noëlaerhabdaceae coccoliths present in our samples (Fig. 3), we present only mass and thickness measurements for coccoliths in the length range 2–5 μm , which exhibit only grey scale colours throughout the time series (Fig. 4). All whole Noëlaerhabdaceae coccoliths were analysed with a minimum of 300 per sample. Coccolith length, width and area were also measured. Coccolith mass values in this study are comparable to published data using similar birefringence-based methods (Supplementary Fig. 11). To isolate the component of variation in coccolith thickness that represents a change in calcification and does not occur as a direct result of changes in coccolith size, we (1) examine changes in thickness within narrow size classes (2–3, 3–4 and 4–5 μm), and (2) calculate SN thickness of coccoliths within each size classes to further verify that changes in thickness are not a direct result of size changes (that is, the expectation that a larger coccolith is thicker as a result of isometric scaling). Following ref. 75, we use the equation:

$$\text{SN thickness} = [(\text{ML} - \text{CL}) \times \text{S}] + \text{CT}, \quad (1)$$

where ML is the mean coccolith length within the size fraction in question over the whole time series at a given site (see Supplementary Data 1 for values used), CL is the length of coccolith X in Sample A, S is the slope of the regression between coccolith length and coccolith thickness for all coccoliths in Sample A and CT is the original thickness of coccolith X in Sample A.

Coccolith taxonomy and preservation. We identified coccoliths to genus level only because species-level classification of the smallest Noëlaerhabdaceae can be difficult under the light microscope, and because commonly used *Reticulofenestra* species assignments are primarily based on size⁷⁶. Although most coccoliths were complete, some were found to be missing a piece of the outer rim cycle of one or both shields when observed under the SEM. To verify that such fragmentation did not result in underestimation of coccolith mass per unit area, we quantify this potential effect from SEM images of the 2–5 μm fraction of fossil samples and estimated the percentage of mass loss for individual Noëlaerhabdaceae coccoliths due to fragmentation (minimum 50 coccoliths per sample) using C-Calci. In these calculations, we assumed that 50% of the total mass of each coccolith comes from the inner rim cycle and central area structure (bridge and/or grill), and that the outer rim cycle of each shield contributed 25% of the total mass. These assumptions were based on mass analyses of very well-preserved modern water column samples containing a mixture of *Gephyrocapsa* and *E. huxleyi* coccoliths. In these samples, mean contribution of inner rim plus central area to total mass was $63 \pm 10\%$ (1 s.d.), therefore our choice of 50% for fossil Noëlaerhabdaceae calculations is conservative.

Coccolith dimensions are used to infer cell size, based on relationships between coccolith length and cell size for Noëlaerhabdaceae^{13,52}. On this basis, we attribute geochemical results from large coccoliths (8–10 μm) as those characterizing larger cells, and those of smaller coccoliths (3–5 μm) as those characterizing small cells. k_s values (originally devised to estimate mass from coccolith shape), were calculated from fossil coccolith mass and length data using the equation of ref. 77:

$$k_s = \text{mass} / [2.71 \times \text{length}^3] \quad (2)$$

We verify that temporal patterns in Noëlaerhabdaceae coccolith mass and thickness result only from primary biomineralization and not from abiogenic post-depositional overgrowth using qualitative preservation indices and SEM images (see Results, Supplementary Data 1; Supplementary Figs 4 and 5). Noëlaerhabdaceae with a closed central area occur in some samples older than 10 Myr ago at both sites, and because of the presence of some overgrowth near the central area in some specimens, we remain cautious in always identifying this as a primary morphological feature. Almost all *Reticulofenestra* in the 2–5 μm fraction of our 14 Myr ago sample at Site NGHP-01-01A have closed central areas and this appears to be a primary feature (Supplementary Fig. 5s,t), resulting in very high mean SN thickness and k_s values in this sample (Fig. 4). *Cyclargolithus* coccoliths were seen sporadically in our oldest samples, although these were all > 5 μm .

Assumptions related to coccoliths per cell. Estimation of changing cellular calcite/SA from coccolith thickness requires that cellular calcite/SA be regulated more strongly by coccolith thickness than by the number of coccoliths per cell. Modern Noëlaerhabdaceae coccolithophore cells are typically covered with a monolayer comprised of interlocking coccoliths, with the exception of *E. huxleyi* that has a higher tendency to produce multi-layered coccospheres⁷⁸. The number of coccoliths per cell has been shown to vary with the cell division cycle of a coccolithophore, with the accumulation of extra coccoliths immediately before cell division to ensure adequate coverage of the two daughter cells⁶⁸. Recent work in culture⁷⁹ has confirmed that stationary phase cells, which are essentially paused in the stage just prior to cell division due to lack of nutrients, are more often covered with a higher number of coccoliths compared with exponentially growing cells. While natural populations in the ocean contain cells at a variety of life stages, that is, not synchronized in the same way as a culture population, populations of *Coccolithus pelagicus* recovered from the surface ocean during the North Atlantic spring bloom still have on average around 20–25% fewer coccolith per cell than populations growing in non-bloom conditions, analogous to in culture⁷⁹. These differences may be useful in characterizing major swings in productivity in fossil populations, in the rare cases where exceptional preservation conserves a large number of intact coccospheres. Quantification of changes in mean number of coccoliths per cell in fossil populations is not possible in this study because it requires significant numbers of whole coccospheres to be preserved, a phenomenon that is rare in deep, open-ocean sites such as ours (selected to be representative of global change) and on the long timescales at which we are working at a single site. However, in sediment populations such as those in our study, which integrate a time window of a few hundred to a thousand years (taking into account sedimentation rates and bioturbation), seasonal and inter-annual productivity changes that might cause higher representation of one growth phase versus another and concomitant changes in coccoliths per cell are likely averaged out. In addition, export of phytoplankton to the sediments is typically biased towards high production periods, so the significance of true stationary phase growth to export and the sediment population is likely diminished.

Stable isotopes in foraminifers. Isotope data for two planktic foraminiferal species at Sites NGHP-01-01A and ODP Site 925 were generated. Approximately 25 individuals of *G. sacculifer* (without sac-like final chamber) and *G. menardii* were picked from the 250–350- μm and the 300–400- μm size fractions, respectively. Foraminifers were broken open and ultrasonicated in methanol to remove fine fraction contamination, rinsed with MilliQ water, dried at 55 °C, and analysed on a Nu Instruments Perspective DI-IRMS connected to an automated carbonate

preparation system (Nu Carb), with an analytical precision of 0.06‰ for $\delta^{18}\text{O}$ and 0.05‰ for $\delta^{13}\text{C}$ (1 σ), at Oviedo University.

The variable depth habitats of planktic foraminifers allow us to reconstruct changes in upper water column properties via oxygen and carbon isotopic gradients. In tropical open-ocean settings such as those overlying our two sites, *G. sacculifer* is thought to live and calcify in the upper mixed layer of the ocean, whereas *G. menardii* favours the upper-middle thermocline^{24,25,80,81}. To a first order, foraminiferal $\delta^{18}\text{O}$ gradients between the upper mixed layer and thermocline in well-stratified regions of the tropical ocean reflect the upper photic zone temperature and salinity gradients²⁴, although some additional physiological (vital effects) and environmental (for example, carbonate ion concentration) factors also affect isotopic fractionation⁸¹. Foraminiferal $\delta^{13}\text{C}$ gradients between the upper mixed layer, the thermocline and the deep ocean at both sites were used to evaluate the depth of organic matter remineralisation, following refs 60,61. Planktic foraminiferal $\delta^{13}\text{C}$ values were corrected to dissolved inorganic carbon (DIC) following ref. 81.

Stable isotopes in coccoliths. Samples were disaggregated and micro-filtered in 2% ammonia to separate coccolith size fractions (<3, 3–5, 5–8 and 8–10 μm), which were rinsed three times with MilliQ water and dried at 55 °C. All coccolith fractions were examined under the microscope, and fractions from Site NGHP-01-01A were found to be heavily contaminated with fragments of non-coccolith carbonate. For this reason, isotope data for these samples are not presented or considered further. At ODP Site 925, coccolith size fractions contain solely coccolith carbonate. In samples older than 3 Myr ago, coccolith fragments contribute significantly to the <3 μm fraction so data points were excluded. Coccolith samples were analysed as described above for foraminifers. Mean reproducibility, based on duplicate analyses of splits of 22 random coccolith samples from Site 925, is 0.08‰ for $\delta^{18}\text{O}$ and 0.07‰ for $\delta^{13}\text{C}$ (1 σ). $\epsilon_{\text{coccolith}}$ of small and large coccoliths was calculated from coccolith $\delta^{13}\text{C}$ relative to *G. menardii* $\delta^{13}\text{C}$ because this foraminiferal species calcifies in equilibrium with $\delta^{13}\text{C}$ DIC⁸¹, and also has a similar depth habitat to the coccolithophores with maximum abundances in the chlorophyll maximum near the thermocline⁸², such that

$$\epsilon_{\text{coccolith}} = \delta^{13}\text{C}_{\text{coccolithsizefraction}} - \delta^{13}\text{C}_{G.\text{menardii}} \quad (3)$$

$$\text{Propagated analytical uncertainty of } \epsilon_{\text{coccolith}} = \sqrt{((0.05)^2 + (0.05)^2)}. \quad (4)$$

For one sample around 2 Myr ago, there was an insufficient number of *G. menardii* individuals for analysis, therefore we were unable to calculate $\epsilon_{\text{coccolith}}$.

See Supplementary Methods for details of carbon isotope determinations in alkenones, \bar{v}_p and $[\text{CO}_{2\text{aq}}]$ calculations, and details on ACTI-CO simulations to quantify the effect of changing active uptake on $[\text{CO}_{2\text{aq}}]$ estimates.

References

- Klaas, C. & Archer, D. E. Association of sinking organic matter with various types of mineral ballast in the deep sea: implications for the rain ratio. *Global Biogeochem. Cycles* **16**, 1–14 (2002).
- Hain, M., Sigman, D. & Haug, G. in *Treatise on Geochemistry* 2nd edn, Vol. 8(18) (eds Mottl, M. J. & Elderfield, Henry) 485–517 (2013).
- Feely, R. A. *et al.* Impact of anthropogenic CO_2 on the CaCO_3 system in the oceans. *Science* **305**, 362–366 (2004).
- Rost, B., Zondervan, I. & Wolf-Gladrow, D. Sensitivity of phytoplankton to future changes in ocean carbonate chemistry: current knowledge, contradictions and research directions. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **373**, 227–237 (2008).
- Bach, L. T., Bauke, C., Meier, K. J. S., Riebesell, U. & Schulz, K. G. Influence of changing carbonate chemistry on morphology and weight of coccoliths formed by *Emiliania huxleyi*. *Biogeosciences* **9**, 3449–3463 (2012).
- Bach, L. T. *et al.* Dissecting the impact of CO_2 and pH on the mechanisms of photosynthesis and calcification in the coccolithophore *Emiliania huxleyi*. *New Phytol.* **199**, 121–134 (2013).
- Jones, B. M. *et al.* Responses of the *Emiliania huxleyi* proteome to ocean acidification. *PLoS One* **8**, e61868 (2013).
- Langer, G. *et al.* Species-specific responses of calcifying algae to changing seawater carbonate chemistry. *Geochim. Geophys. Geosyst.* **7**, Q09006 (2006).
- Langer, G., Nehrke, G., Probert, I., Ly, J. & Ziveri, P. Strain-specific responses of *Emiliania huxleyi* to changing seawater carbonate chemistry. *Biogeosciences* **6**, 2637–2646 (2009).
- Jin, P., Gao, K. & Beardall, J. Evolutionary responses of a coccolithophorid *Gephyrocapsa oceanica* to ocean acidification. *Evolution* **67**, 1869–1878 (2013).
- Lohbeck, K. T., Riebesell, U. & Reusch, T. B. Adaptive evolution of a key phytoplankton species to ocean acidification. *Nat. Geosci.* **5**, 346–351 (2012).
- Hannisdal, B., Henderiks, J. & Liow, L. H. Long-term evolutionary and ecological responses of calcifying phytoplankton to changes in atmospheric CO_2 . *Global Change Biol.* **18**, 3504–3516 (2012).
- Henderiks, J. Coccolithophore size rules - reconstructing ancient cell geometry and cellular calcite quota from fossil coccoliths. *Mar. Micropaleontol.* **67**, 143–154 (2008).
- Bolton, C. T. & Stoll, H. M. Late Miocene threshold response of marine algae to carbon dioxide limitation. *Nature* **500**, 558–562 (2013).
- Beaufort, L. *et al.* Sensitivity of coccolithophores to carbonate chemistry and ocean acidification. *Nature* **476**, 80–83 (2011).
- Meier, K. J. S., Beaufort, L., Heussner, S. & Ziveri, P. The role of ocean acidification in *Emiliania huxleyi* coccolith thinning in the Mediterranean Sea. *Biogeosciences* **11**, 2857–2869 (2014).
- Horigome, M. T. *et al.* Environmental controls on the *Emiliania huxleyi* calcite mass. *Biogeosciences* **11**, 2295–2308 (2014).
- Meier, K. J. S., Berger, C. & Kinkel, H. Increasing coccolith calcification during CO_2 rise of the penultimate deglaciation (Termination II). *Mar. Micropaleontol.* **112**, 1–12 (2014).
- Gibbs, S. J., Robinson, S. J., Bown, P. R., Dunkley Jones, T. & Henderiks, J. Comment on "Calcareous nannoplankton response to surface-water acidification around Oceanic Anoxic Event 1a". *Science* **332**, 175 (2011).
- Riebesell, U. *et al.* Reduced calcification of marine plankton in response to increased atmospheric CO_2 . *Nature* **407**, 364–367 (2000).
- Read, B. A. *et al.* Pan genome of the phytoplankton *Emiliania* underpins its global distribution. *Nature* **499**, 209–213 (2013).
- Kameo, K. & Bralower, T. J. in *Proceedings of the Ocean Drilling Program. Scientific Results* 165 (eds Leckie, R. M., Sigurdsson, H., Acton, G. D. & Draper, G.) 3–17 (Ocean Drilling Program, 2000).
- Young, J. R. Size variation of Neogene *Reticulofenestra* coccoliths from Indian Ocean DSDP cores. *J. Micropaleontol.* **9**, 71–85 (1990).
- Steph, S., Regenberg, M., Tiedemann, R., Mulitza, S. & Nürnberg, D. Stable isotopes of planktonic foraminifera from tropical Atlantic/Caribbean core-tops: Implications for reconstructing upper ocean stratification. *Mar. Micropaleontol.* **71**, 1–19 (2009).
- Chaisson, W. & Ravelo, A. In *Proceedings of the Ocean Drilling Program. Scientific Results* 255–268 (Ocean Drilling Program, 1997).
- Rost, B., Zondervan, I. & Riebesell, U. Light-dependent carbon isotope fractionation in the coccolithophorid *Emiliania huxleyi*. *Limnol. Oceanogr.* **47**, 120–128 (2002).
- Cassar, N., Laws, E. A. & Popp, B. N. Carbon isotopic fractionation by the marine diatom *Phaeodactylum tricornutum* under nutrient- and light-limited growth conditions. *Geochim. Cosmochim. Acta* **70**, 5323–5335 (2006).
- Gupta, A. K., Singh, R. K., Joseph, S. & Thomas, E. Indian Ocean high-productivity event (10–8 Ma): linked to global cooling or to the initiation of the Indian monsoons? *Geology* **32**, 753–756 (2004).
- Diester-Haass, L., Billups, K. & Emeis, K. C. In search of the late Miocene-early Pliocene "biogenic bloom" in the Atlantic Ocean (Ocean Drilling Program Sites 982, 925, and 1088). *Paleoceanography* **20** (2005).
- Seki, O. *et al.* Alkenone and boron-based Pliocene $p\text{CO}_2$ records. *Earth. Planet. Sci. Lett.* **292**, 201–211 (2010).
- Pagani, M. in *Treatise on Geochemistry* 2nd edn (2014).
- Henderiks, J. & Pagani, M. Refining ancient carbon dioxide estimates: significance of coccolithophore cell size for alkenone-based $p\text{CO}_2$ records. *Paleoceanography* **22** (2007).
- van de Wal, R. S., de Boer, B., Lourens, L. J., Köhler, P. & Bintanja, R. Reconstruction of a continuous high-resolution CO_2 record over the past 20 million years. *Clim. Past* **7**, 1459–1469 (2011).
- Hopkinson, B. M., Dupont, C. L., Allen, A. E. & Morel, F. M. M. Efficiency of the CO_2 -concentrating mechanism of diatoms. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **108**, 3830–3837 (2011).
- Laws, E. A., Popp, B. N., Cassar, N. & Tanimoto, J. ^{13}C discrimination patterns in oceanic phytoplankton: likely influence of CO_2 concentrating mechanisms, and implications for palaeoreconstructions. *Funct. Plant Biol.* **29**, 323–333 (2002).
- Hönisch, B., Hemming, N. G., Archer, D., Siddall, M. & McManus, J. F. Atmospheric carbon dioxide concentration across the mid-Pleistocene transition. *Science* **324**, 1551–1554 (2009).
- Zhang, Y. G., Pagani, M., Liu, Z., Bohaty, S. M. & DeConto, R. A 40 million-year history of atmospheric CO_2 . *Phil. Trans. R. Soc. A* **371**, 20130096 (2013).
- Lüthi, D. *et al.* High-resolution carbon dioxide concentration record 650,000–800,000 years before present. *Nature* **453**, 379–382 (2008).
- Clark, P. U. *et al.* The middle Pleistocene transition: characteristics, mechanisms, and implications for long-term changes in atmospheric $p\text{CO}_2$. *Quat. Sci. Rev.* **25**, 3150–3184 (2006).
- Markovic, S., Paytan, A. & Wortmann, U. G. Pleistocene sediment offloading and the global sulfur cycle. *Biogeosciences* **12**, 3043–3060 (2015).
- Tyrrell, T. & Zeebe, R. E. History of carbonate ion concentration over the last 100 million years. *Geochim. Cosmochim. Acta* **68**, 3521–3530 (2004).

42. Beaufort, L., Couapel, M., Buchet, N., Claustre, H. & Goyet, C. Calcite production by coccolithophores in the south east Pacific Ocean. *Biogeosciences* **5**, 1101–1117 (2008).
43. Cubillos, J. *et al.* Calcification morphotypes of the coccolithophorid *Emiliana huxleyi* in the Southern Ocean: changes in 2001 to 2006 compared to historical data. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **348**, 47–54 (2007).
44. Henderiks, J. *et al.* Environmental controls on *Emiliana huxleyi* morphotypes in the Benguela coastal upwelling system (SE Atlantic). *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **448**, 51–66 (2012).
45. Poulton, A. J., Young, J. R., Bates, N. R. & Balch, W. M. Biometry of detached *Emiliana huxleyi* coccoliths along the Patagonian Shelf. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **443**, 1–17 (2011).
46. Smith, H. E. K. *et al.* Predominance of heavily calcified coccolithophores at low CaCO₃ saturation during winter in the Bay of Biscay. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **109**, 8845–8849 (2012).
47. Poulton, A. J. *et al.* Coccolithophores on the north-west European shelf: calcification rates and environmental controls. *Biogeosciences* **11**, 3919–3940 (2014).
48. Ridgwell, A. *et al.* From laboratory manipulations to Earth system models: scaling calcification impacts of ocean acidification. *Biogeosciences* **6**, 2611–2623 (2009).
49. De Bodt, C., Van Oostende, N., Harlay, J., Sabbe, K. & Chou, L. Individual and interacting effects of pCO₂ and temperature on *Emiliana huxleyi* calcification: study of the calcite production, the coccolith morphology and the coccosphere size. *Biogeosciences* **7**, 1401–1412 (2010).
50. Iglesias-Rodriguez, M. D. *et al.* Phytoplankton calcification in a high-CO₂ world. *Science* **320**, 336–340 (2008).
51. Langer, G. & Bode, M. CO₂ mediation of adverse effects of seawater acidification in *Calcidiscus leptoporus*. *Geochem. Geophys. Geosyst.* **12**, Q05001 (2011).
52. Henderiks, J. & Pagani, M. Coccolithophore cell size and the Paleogene decline in atmospheric CO₂. *Earth. Planet. Sci. Lett.* **269**, 576–584 (2008).
53. Foster, G. L., Lear, C. H. & Rae, J. W. B. The evolution of pCO₂, ice volume and climate during the Middle Miocene. *Earth. Planet. Sci. Lett.* **341–344**, 243–254 (2012).
54. Taylor, A. R., Chrachri, A., Wheeler, G., Goddard, H. & Brownlee, C. A voltage-gated H⁺ channel underlying pH homeostasis in calcifying coccolithophores. *PLoS Biol.* **9**, e1001085 (2011).
55. Langer, G., Probert, I., Nehrke, G. & Ziveri, P. The morphological response of *Emiliana huxleyi* to seawater carbonate chemistry changes: an inter-strain comparison. *J. Nanoplankton Res.* **32**, 29–34 (2011).
56. Rickaby, R. E. M., Henderiks, J. & Young, J. N. Perturbing phytoplankton: response and isotopic fractionation with changing carbonate chemistry in two coccolithophore species. *Clim. Past.* **6**, 771–785 (2010).
57. Riebesell, U. & Tortell, P. D. in *Ocean acidification*. (eds Gattuso, J. P. & Hanson, L.) 99–121 (Oxford University Press, 2011).
58. Young, J., Poulton, A. & Tyrrell, T. Morphology of *Emiliana huxleyi* coccoliths on the North West European shelf-is there an influence of carbonate chemistry? *Biogeosci. Discuss.* **11**, 4531–4561 (2014).
59. Suchéras-Marx, B. & Henderiks, J. Downsizing the pelagic carbonate factory: impacts of calcareous nanoplankton evolution on carbonate burial over the past 17 million years. *Glob. Planet. Change.* **123**, 97–109 (2014).
60. John, E. H. *et al.* Warm ocean processes and carbon cycling in the Eocene. *Phil. Trans. R. Soc. A* **371**, 20130099 (2013).
61. Kwon, E. Y., Primeau, F. & Sarmiento, J. L. The impact of remineralization depth on the air–sea carbon balance. *Nat. Geosci.* **2**, 630–635 (2009).
62. Keller, M., Selvin, R., Claus, W. & Guillard, R. Media for the culture of oceanic ultraphytoplankton. *J. Phycol.* **23**, 633–638 (1987).
63. Bradshaw, A., Brewer, P., Shafer, D. & Williams, R. Measurements of total carbon dioxide and alkalinity by potentiometric titration in the GEOSECS program. *Earth. Planet. Sci. Lett.* **55**, 99–115 (1981).
64. Brewer, P., Bradshaw, A. & Williams, R. in *The Changing Carbon Cycle: A Global Analysis* (eds Trabalka, J. R. & Reichle, D. E.) 348–370 (Springer, 1986).
65. Popp, B. N. *et al.* Effect of phytoplankton cell geometry on carbon isotopic fractionation. *Geochim. Cosmochim. Acta* **62**, 69–77 (1998).
66. Menden-Deuer, S. & Lessard, E. J. Carbon to volume relationships for dinoflagellates, diatoms, and other protist plankton. *Limnol. Oceanogr.* **45**, 569–579 (2000).
67. Montagnes, D. J., Berges, J. A., Harrison, P. J. & Taylor, F. Estimating carbon, nitrogen, protein, and chlorophyll a from volume in marine phytoplankton. *Limnol. Oceanogr.* **39**, 1044–1060 (1994).
68. Zondervan, I., Rost, B. & Riebesell, U. Effect of CO₂ concentration on the PIC/POC ratio in the coccolithophore *Emiliana huxleyi* grown under light-limiting conditions and different daylengths. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* **272**, 55–70 (2002).
69. Fuertes, M. A., Flores, J. A. & Sierro, F. J. The use of circularly polarized light for biometry, identification and estimation of mass of coccoliths. *Mar. Micropaleontol.* **113**, 44–55 (2014).
70. Beaufort, L. Weight estimates of coccoliths using the optical properties (birefringence) of calcite. *Micropaleontology* **51**, 289–297 (2005).
71. Beaufort, L., Barbarin, N. & Gally, Y. Optical measurements to determine the thickness of calcite crystals and the mass of thin carbonate particles such as coccoliths. *Nat. Protoc.* **9**, 633–642 (2014).
72. Flores, J. A. *et al.* Sedimentation rates from calcareous nannofossil and planktonic foraminifera biostratigraphy in the Andaman Sea, northern Bay of Bengal, and Eastern Arabian Sea. *Mar. Pet. Geol.* **58**, 425–437 (2014).
73. Shackleton, N., Crowhurst, S., Weedon, G. & Laskar, J. Astronomical calibration of Oligocene–Miocene time. *Phil. Trans. R. Soc. London Ser. A* **357**, 1907–1929 (1999).
74. Flores, J. & Sierro, F. Revised technique for calculation of calcareous nannofossil accumulation rates. *Micropaleontology* **43**, 321–324 (1997).
75. O’Dea, S. A. *et al.* Coccolithophore calcification response to past ocean acidification and climate change. *Nat. Commun.* **5**, 5363 (2014).
76. Young, J. in *Calcareous Nannofossil Biostratigraphy* 225–265 (1998).
77. Young, J. & Ziveri, P. Calculation of coccolith volume and its use in calibration of carbonate flux estimates. *Deep Sea Res. Part II* **47**, 1679–1700 (2000).
78. Hoffmann, R. *et al.* Insight into *Emiliana huxleyi* coccospheres by focused ion beam sectioning. *Biogeosciences* **12**, 825–834 (2015).
79. Gibbs, S. J. *et al.* Species-specific growth response of coccolithophores to Palaeocene–Eocene environmental change. *Nat. Geosci.* **6**, 218–222 (2013).
80. Farmer, E. C., Kaplan, A., de Menocal, P. B. & Lynch-Stieglitz, J. Corroborating ecological depth preferences of planktonic foraminifera in the tropical Atlantic with the stable oxygen isotope ratios of core top specimens. *Paleoceanography* **22** (2007).
81. Spero, H. J., Mielke, K. M., Kalve, E. M., Lea, D. W. & Pak, D. K. Multispecies approach to reconstructing eastern equatorial Pacific thermocline hydrography during the past 360 kyr. *Paleoceanography* **18** (2003).
82. Tedesco, K., Thunell, R., Astor, Y. & Muller-Karger, F. The oxygen isotope composition of planktonic foraminifera from the Cariaco Basin, Venezuela: Seasonal and interannual variations. *Mar. Micropaleontol.* **62**, 180–193 (2007).
83. Diester-Haass, L. *et al.* Mid-Miocene paleoproductivity in the Atlantic Ocean and implications for the global carbon cycle. *Paleoceanography* **24**, PA1209 (2009).
84. Pagani, M., Zachos, J. C., Freeman, K. H., Tipler, B. & Bohaty, S. Marked decline in atmospheric carbon dioxide concentrations during the Paleogene. *Science* **309**, 600–603 (2005).
85. Pagani, M., Arthur, M. A. & Freeman, K. H. Miocene evolution of atmospheric carbon dioxide. *Paleoceanography* **14**, 273–292 (1999).
86. Zachos, J. C., Dickens, G. R. & Zeebe, R. E. An early Cenozoic perspective on greenhouse warming and carbon-cycle dynamics. *Nature* **451**, 279–283 (2008).

Acknowledgements

We thank Torsten Bickert and Jeroen Groeneveld for access to unpublished data, and Heiko Pälike and Simon Crowhurst for advice regarding the ODP Site 925 age model. This paper benefitted from discussions with Luc Beaufort, Ian Bailey, Kaustubh Thirumalai, Samantha Gibbs and Paul Bown. We thank the Department of Biology of Universities and Systems at the University of Oviedo for access to facilities for culturing coccolithophores. This is a contribution of the Asturias Marine Observatory. This work used samples provided by the (Integrated) Ocean Drilling Program (IODP) and the Indian National Gas Hydrate Program (NGHP). The IODP is sponsored by the US National Science Foundation and participating countries under management of the IODP Management International, Inc (IODP-MI). NGHP01 was planned and managed through collaboration between the Directorate General of Hydrocarbons (DGH) under the Ministry of Petroleum and Natural Gas (India), the US Geological Survey (USGS) and the Consortium for Scientific Methane Hydrate Investigations (CSMHI) led by Overseas Drilling Limited (ODL) and FUGRO McClelland Marine Geosciences (FUGRO). We thank those who contributed to the success of the NGHP Expedition 01 (NGHP01). C.T.B. acknowledges OSU-Institut Pythéas. Funding for this research was provided by the European Research Council under grant UE-09-ERC-2009-STG-240222-PACE (HMS), the Principado de Asturias under award FC-13-COF13-044 (HMS) and a French ANR infrastructure project EMBRC-France (IP).

Author contributions

H.M.S. designed the research. C.T.B., M.T.H.S., L.A. and A.M.V. prepared and analysed geochemical samples. I.P. provided coccolithophore strains and culturing expertise. S.G.L. cultured coccolithophores. S.G.L. and C.T.B. performed modern and fossil microscopy and image analysis, respectively. C.T.B., M.T.H.S. and H.M.S. analysed data and performed calculations. J.A.F. and M.A.F. contributed new analytical tools. L.G. and J.J. contributed expertise and samples from Site NGHP-01-01A. C.T.B. and H.M.S. wrote the paper with feedback from all authors.

Additional information

Supplementary Information accompanies this paper at <http://www.nature.com/naturecommunications>

Competing financial interests: The authors declare no competing financial interests.

Reprints and permission information is available online at <http://npg.nature.com/reprintsandpermissions/>

How to cite this article: Bolton, C. T. *et al.* Decrease in coccolithophore calcification and CO₂ since the middle Miocene. *Nat. Commun.* 7:10284 doi: 10.1038/ncomms10284 (2016).



This work is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in the credit line; if the material is not included under the Creative Commons license, users will need to obtain permission from the license holder to reproduce the material. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>

III. Registro de propiedad intelectual

Registro de propiedad intelectual del programa C-nanopattern, que contiene parte del código integrado en el programa C-Calcita que se describe en el capítulo IV.



• **Titular cesionario:** UNIVERSIDAD DE SALAMANCA

Nacionalidad: ESP

D.N.I./N.I.F./Pasaporte: Q-3718001-E

Titular/es cesionario/s por transmisión intervivos de los derechos de explotación en la naturaleza y condiciones que se expresan a continuación:

Derechos cedidos: Todos los derechos de explotación transmisibles.

Modalidades cedidas: Según el Art. 43.2 de la L.P.I.

Ámbito territorial: Mundial

Ámbito temporal: Hasta su paso a dominio público

Caracter de la cesión: Exclusiva

Fecha de la cesión: 15/02/2014

• **Cedente:** FUERTES PRIETO, Miguel Ángel

Nacionalidad: ESP

D.N.I./N.I.F./Pasaporte: 11944412-Y

Extracto: Por documento privado de cesión de derechos de propiedad intelectual de fecha 15 de febrero de 2014, suscrito, con firmas legitimadas notarialmente, de una parte, por D. Juan Manuel Corchado Rodríguez, en su calidad de Vicerrector de Investigación y Transferencia de la Universidad de Salamanca y representante legal de dicha Universidad, y de otra, por D. Miguel Ángel Fuertes Prieto, en su calidad de autor de la obra, cede en exclusiva a la Universidad de Salamanca el 50% de los derechos patrimoniales que detenta sobre el programa de ordenador.

Como contraprestación a la cesión de derechos, el autor percibirá un 25 por ciento de los beneficios obtenidos de la futura comercialización del programa de ordenador y de sus sucesivas versiones, al que se aplicarán los impuestos y retenciones fiscales vigentes en cada momento.

Quedan, por tanto, inscritos los derechos de explotación sobre dicha obra, en los términos expuestos, a favor de la Universidad de Salamanca (N.I.F. Q-3718001-E).

Datos de la solicitud

Núm. solicitud: SA-39-14

Fecha de presentación y efectos: 26/02/2014 **Hora:** 13:05

En Madrid, a ocho de mayo de dos mil catorce



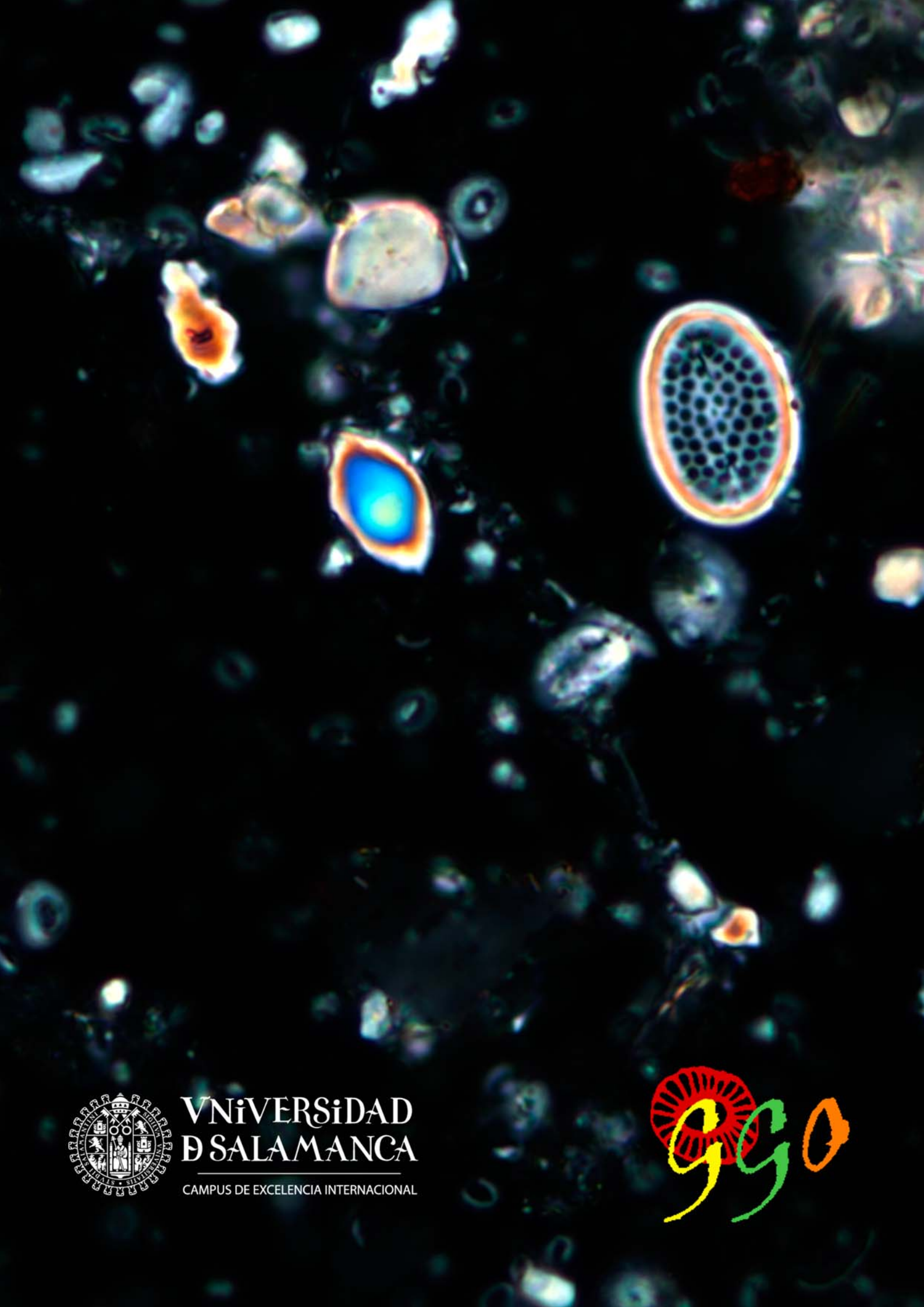
EL REGISTRADOR CENTRAL

Miguel Ángel Calle Izquierdo

IV. CD-ROM programa C-Calcita

CD-ROM con el ejecutable del programa C-Calcita, imágenes de muestra y las mediciones utilizadas para la elaboración de los capítulos IV, V y VI.

El programa C-Calcita ha sido diseñado y probado para Windows. Con el fin de que el equipo entienda los comandos y órdenes del mismo es necesario tener instalada la versión 7.11 del Matlab Compiler Runtime (MCR), cuyo instalador se adjunta también.



VNiVERSIDAD
D SALAMANCA

CAMPUS DE EXCELENCIA INTERNACIONAL

