



CORAL
REEF ALLIANCE

Photo By: Antonio Busiello

Protocolos para Monitoreo de la
**Calidad de Agua Marina en el
Sistema Arrecifal Mesoamericano**



Bay Islands Conservation Association, Coastal Zone Management
Authority and Institute, Healthy Reefs Initiative y The Coral Reef Alliance



Este trabajo fue financiado por The Summit Foundation y por un donante anónimo.

Elaborado por:

Mayra Núñez-Vallecillo, Zara Lizzeth Zúniga, Giselle Brady,
Samir Rosado y Antonella Rivera



Colaboradores.

Melanie McField
Helen Fox
Jenny Myton
Javier Pizaña
Mélina Soto
Nicole Craig
Tanya Amaya
Alejandro López
Viridiana Nava
Juan Pedro Zapotecas
Rosa Loreto
Mireya Carrillo
Arlene Young
Arreini Palacio
Kirah Forman
Ely Augustinus
Braulio Gutiérrez
Ricardo González-Gil

Healthy Reefs Initiative
Coral Reef Alliance
Coral Reef Alliance
Coral Reef Alliance
Healthy Reefs Initiative
Healthy Reefs Initiative
Coral Reef Alliance
Centinelas del Agua
Centinelas del Agua
Centinelas del Agua
Amigos de Sian Ka'an
Amigos de Sian Ka'an
Coastal Zone Management Authority and Institute
Southern Environmental Association
Hol Chan Marine Reserve
Bay Islands Conservation Association, Utila chapter
Bay Islands Conservation Association, Utila chapter
Consultor



Contenido.

6	Introducción
8	Objetivos
10	Descripción de parámetros
12	Diseño de muestreo
14	Seguridad en campo
14	Caracterización del sitio
14	Garantía y control de calidad
16	Nomenclatura de las muestras
17	Toma de muestras de agua
18	Protocolo de colecta de patógenos
19	Protocolo de colecta de parámetros biofísicos
20	Calibración del YSI ProDSS
21	Protocolo de colecta de nutrientes
21	Amoniaco (NH_3)
24	Nitrito (NO_2)
25	Nitrato (NO_3)
27	Fósforo (P)
30	Protocolo para colecta de isótopos
31	Registro de información y base de datos
32	Bibliografía
33	Anexos

Siglas y abreviaturas.

AMP: Áreas Marinas Protegidas	MDL: Nivel de detección
BICA: Bay Islands Conservation Association	MRL: Niveles máximos de residuos
CCG: Cambio Climático Global	PE: Algas totales ficoeritrina
CCME: Canadian Council of Ministers of the Environment	SAL: Salinidad
CHL: Clorofila	SAM: Sistema Arrecifal Mesoamericano
CON: Conductividad	SOP: Procedimientos de Operación Estándar
CZMAI: Coastal Zone Management Authority and Institute	SDWA: Normativas de E.E.U.U. para el agua potable
DO: Oxígeno Disuelto	WQ: Calidad de agua
LFB: Laboratorio Fortificado en Blanco	YSI: Sondas para el monitoreo de calidad de agua
LFM: Matriz fortificada de laboratorio	

Índice de figuras.

Figura 1. Sitios propuesto para realizar la colecta de muestras para monitoreo de calidad de agua en el Sistema Arrecifal Mesoamericano (SAM).....	12
Figura 2. Técnica para tomar muestras en aguas superficiales. Tomado de EPA, 2009.....	17
Figura 3. Volumen estándar de vaso de calibración. Tomado de manual YSI ProDSS, 2014.....	19
Figura 4. Menú de Calibración de sensores.....	20

Índice de tablas.

Tabla 1. Parámetros de calidad de agua y justificación de la medición.....	11
Tabla 2. Sitios propuestos para realizar el muestreo de calidad de agua en el SAM.....	13
Tabla 3. Caracterización de las localidades que se monitorearán en la fase 1 del proyecto.....	15
Tabla 4. Nomenclatura para cada localidad de monitoreo.....	16
Tabla 5. Materiales y equipo a utilizar en el monitoreo y en la colecta de patógenos de agua marina en el SAM.....	18
Tabla 6. Materiales a utilizar en la colecta de nutrientes en agua marina en el SAM.....	20
Tabla 7. Materiales y equipo para utilizar en la colecta de isótopos en agua marina en el SAM....	30

Introducción.

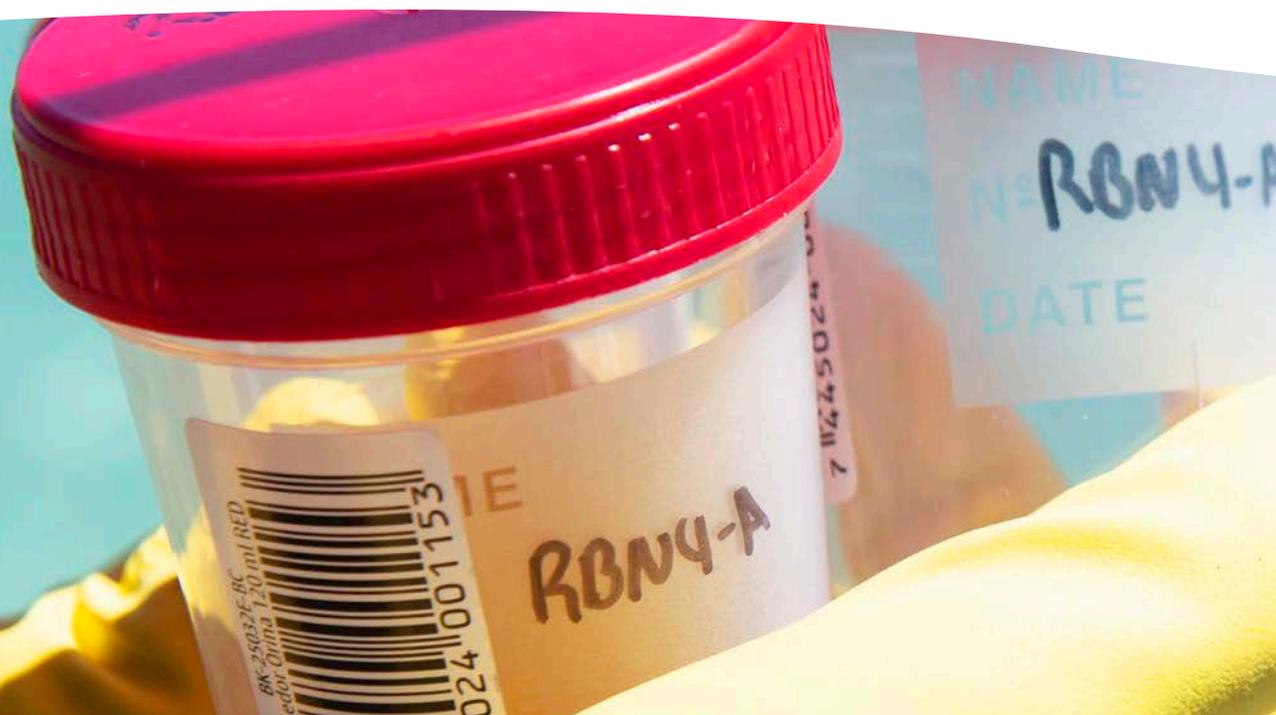
El monitoreo de calidad de agua marina es una herramienta importante para la gestión de los recursos marinos, ya que permite evaluar las tendencias temporales y espaciales de la calidad o estado del ambiente (Baird et al., 2017). El monitoreo de calidad de agua marina facilita el conocimiento para implementar acciones que eviten que la degradación ambiental continúe e incremente. En la región del Sistema Arrecifal Mesoamericano (SAM) se ha reportado en los últimos años un incremento de macroalgas (McField et al., 2020). La proliferación de macroalgas amenaza la resiliencia de los arrecifes de coral, a medida que crecen sobre los corales evitan el asentamiento larval y compiten por espacio (Mumby et al., 2014). El crecimiento excesivo de algas está relacionado con poblaciones bajas de herbívoros y contaminación de nutrientes debido al ineficiente manejo de las aguas residuales y las actividades agrícolas no sustentables (McField et al., 2020).

Debido a esta problemática surge la necesidad de contar con mejores datos sobre niveles y fuentes de contaminación por nutrientes en

el ecosistema del SAM, el cual se encuentra amenazado. Incluso, muchas especies que dependen de este ecosistema se encuentran en peligro crítico de extinción (e.g. Mero de Nassau y especies del género *Acropora* (Aronson et al., 2008). Aunque existen algunos datos de calidad de agua (WQ, por sus siglas en inglés, water quality) y programas de monitoreo en el SAM, su distribución es irregular en el espacio y tiempo.

Actualmente, las restricciones de viaje y los confinamientos locales implementados dentro de los países del SAM como resultado del brote de COVID-19 proporcionan un "experimento natural" sin precedentes para comprender mejor una fuente importante de contaminación por nutrientes: el turismo.

Debido a esta oportunidad se decidió poner en marcha un programa de monitoreo coordinado a lo largo del SAM. Este permitirá cuantificar cualquier cambio en la calidad del agua, en particular los parámetros asociados con los



impactos de las aguas residuales, junto con los cambios en los niveles de turismo a medida que los países abran de nuevo sus actividades económicas.

Este proyecto se divide en dos fases para evaluar la WQ en el SAM, la Fase 1 consiste en generar información crítica enfocada en cuantificar los impactos humanos derivados de las aguas residuales. Se dará prioridad a los sitios donde se sospecha que la afectación por el turismo sea más significativa y se incluirán sitios de control clave que no sean tan influenciados por las fluctuaciones relacionadas con el turismo, proporcionando datos cuantitativos muy necesarios. Los datos recopilados durante la Fase 1, así como de varios proyectos complementarios en un marco de tiempo similar, sentarán las bases para una segunda fase. En la Fase 2 se expandirán espacialmente los sitios de muestreo de la fase 1 para evaluar en conjunto el enriquecimiento de nutrientes que surge de fuentes urbanas, agropecuarias, industriales y turísticas. Todos estos datos respaldarán los crecientes esfuerzos para implementar soluciones específicas para

mejorar la calidad del agua regional.

El proyecto trata de responder a la pregunta: ¿Cuál es la contribución relativa y absoluta de las aguas residuales generadas por la actividad turística frente a otras fuentes de nutrientes en los destinos clave del SAM? Para esto, se tomarán en cuenta datos con alta resolución espacial y temporal. En consecuencia, se han identificado 5 localidades de muestreo en cada uno de los tres países del SAM más afectados por el turismo (Honduras, Belice y México), y estas se dividen en tres localidades impactadas por el turismo y dos localidades control. En cada uno de estos sitios se muestrearán mensualmente los principales parámetros de calidad del agua diseñados para dilucidar y cuantificar estos impactos.

Este proyecto permite el primer muestreo coordinado de la calidad del agua en la región del SAM, que sentará las bases para priorizar y enfocar las necesidades de muestreo adicionales, así como soluciones más específicas.



Objetivos del proyecto.

Recopilar datos de alta resolución espacial y temporal en sitios donde se espera que las aguas residuales relacionadas con el turismo sean una fuente de contaminación dominante, así como comparar ubicaciones de bajo turismo (control) en el SAM.

Cuantificar cualquier cambio en la calidad del agua en el SAM, en particular los parámetros asociados con los impactos de las aguas residuales, junto con los cambios en los niveles de turismo a medida que se reapertura esta industria en los países del SAM.

Coordinar los esfuerzos de investigación regionales destinados a comprender y mejorar la calidad del agua, incluida la divulgación inicial a los tomadores de decisiones locales y a otros sectores pertinentes.



Objetivos de la guía metodológica.

Estandarizar los protocolos de monitoreo para los tres países de la región, considerando los métodos para la toma de datos de parámetros biofísicos, patógenos, nutrientes e isótopos, para la comparación entre datos.

Desarrollar una base de datos con los resultados sobre la calidad de agua marina en la región del SAM.



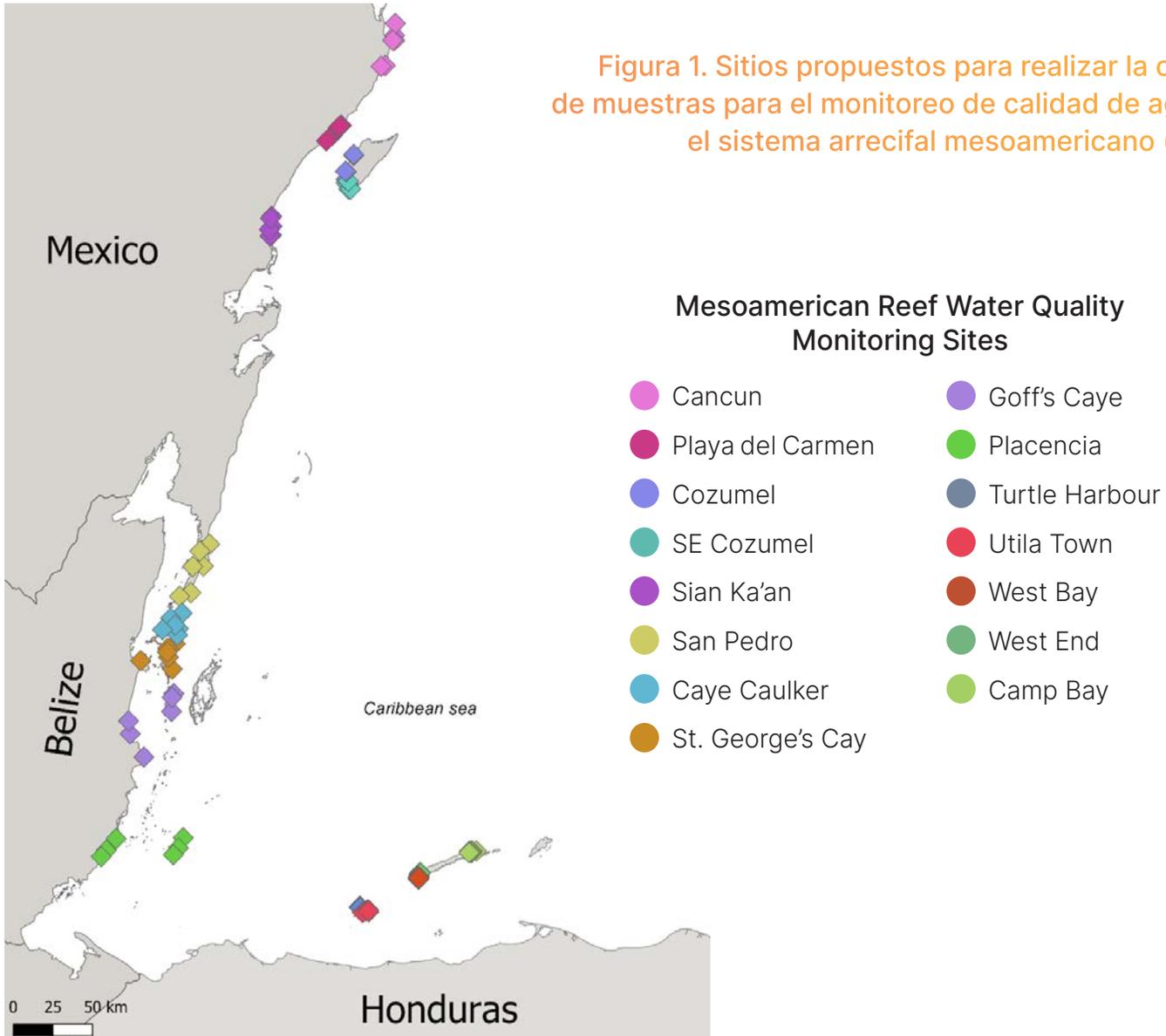
Descripción de parámetros.

Para este estudio se está considerando analizar 4 tipos de indicadores: parámetros biofísicos, patógenos, nutrientes e isótopos. Cada indicador cuenta con parámetros específicos que ayudarán a detectar el efecto de las aguas residuales en aguas marinas del SAM (Tabla 1). Se recopilarán parámetros biofísicos estándar *in situ* con una sonda multiparamétrica (marca YSI), incluyendo la temperatura, la salinidad, el oxígeno y la clorofila (la contaminación por nutrientes en aguas oligotróficas resulta en un aumento en la concentración de clorofila). Los indicadores específicamente dirigidos a cuantificar las aguas residuales humanas son las bacterias indicadoras fecales (enterococos y coliformes totales), estos se medirán en todos los sitios. Así mismo, se realizará un análisis de isótopos N (en muestras de macroalgas y pastos marinos), los cuales permiten estimar el porcentaje de nitrógeno incorporado en la planta que se deriva de las aguas residuales humanas. Además, se recolectarán muestras para análisis inmediato de laboratorio de nutrientes (nitrógeno en sus varias formas y fósforo total) en los sitios de playa donde la proximidad a las fuentes de nutrientes permite la medición potencial incluso en ecosistemas tropicales oligotróficos. Las muestras se analizarán en un laboratorio establecido y certificado en México y en los laboratorios locales en Honduras y Belice, asegurando así que el proyecto apoye a construir la capacidad local y la aceptación nacional de los resultados. Las unidades a utilizar para cada parámetro se describen en el Anexo I.

Tabla 1. Parámetros de calidad de agua y justificación de la medición.

Indicador	Parámetro	Medición	Justificación
Biofísico	Temperatura superficial	<i>In situ</i>	Requerido en algunos cálculos; indicador del Cambio Climático global (CCG).
	pH	<i>In situ</i>	Requerido en algunos cálculos; CCG.
	Sólidos suspendidos totales	<i>In situ</i>	Indicador de escorrentía de nutrientes y sedimentos. Puede reducir la fotosíntesis y el crecimiento de los arrecifes de coral.
	Oxígeno disuelto	<i>In situ</i>	Generalmente se reduce a medida que aumenta la contaminación por nutrientes. Los niveles extremadamente bajos causan la mortalidad directa de la vida marina.
	Conductividad	<i>In situ</i>	Requerido para algunos cálculos e instrumentación.
	Salinidad	<i>In situ</i>	Sus variaciones pueden indicar escorrentía de agua dulce o la advección de distintas masas de agua.
	Turbidez	<i>In situ</i>	Indicador de escorrentía de nutrientes y sedimentación y posibles floraciones de fitoplancton.
	Clorofila	<i>In situ</i>	Proxy para la biomasa de fitoplancton y, potencialmente, indicador de contaminación por nutrientes en un ambiente oligotrófico, ya que el fitoplancton absorbe inmediatamente los nutrientes del agua.
Patógenos	Enterococos	Laboratorio	Indicador específico de aguas residuales humanas en aguas marinas.
	Coliformes totales	Laboratorio	Indicador generalizado de aguas residuales humanas, incluido en la mayoría de las normativas.
Nutrientes	Nitrato	Laboratorio	Subproducto final de las aguas residuales después del tratamiento biológico (natural o dentro de una planta de tratamiento) que proporciona N en la forma más disponible para el crecimiento de algas, bacterias y enfermedades. Promueve cambios ecológicos hacia la proliferación de macroalgas y la disminución de los corales.
	Nitrito	Laboratorio	Producto intermedio después de un proceso de desnitrificación.
	Amoníaco	Laboratorio	Subproducto original en aguas residuales humanas.
	Fósforo total	Laboratorio	Puede ser el nutriente más limitante para el crecimiento de macroalgas, también incluido en los efluentes de aguas residuales.
Isótopos	N15	Laboratorio	Permite estimar la proporción de nitrógeno en las macroalgas derivadas de las aguas residuales humanas.

Figura 1. Sitios propuestos para realizar la colecta de muestras para el monitoreo de calidad de agua en el sistema arrecifal mesoamericano (SAM).



Diseño de muestreo.

La selección y muestreo de sitios en la fase 1 se centrará en 9 lugares turísticos importantes, incluidas las playas y los arrecifes que se considera sean los más afectados por la contaminación de aguas residuales relacionada con el turismo, y 6 lugares de control menos afectados por el turismo. Se tomarán muestras en playas costeras y ecosistemas de arrecifes que se espera que tengan un alto impacto de las aguas residuales relacionadas con el turismo y en zonas donde se espera que dichos impactos sean mínimos según el conocimiento existente de la infraestructura turística y la oceanografía física (ver Figura 1 y Tabla 2).

Nuestro enfoque Antes-Después-Control-Impacto proporciona una base científica rigurosa para evaluar los impactos del turismo en WQ en el SAM. Los siete años de muestreo mensual de la Bay Island Conservation Association (BICA) en las Islas de la Bahía de Honduras han revelado una variabilidad sustancial entre sitios e intra-sitios. Por ende, el uso de una frecuencia de muestreo mensual (igual que la de BICA), en este estudio nos permitirá comprender mejor los principales factores que afectan la de la calidad del agua en el SAM.

Tabla 2. Sitios propuestos para realizar el muestreo de calidad de agua en el SAM.

País	Tratamiento	Localidad	Ecosistema	No. de Sitios	
México	Control	Sian Ka'an	Playa	3	
			Arrecife	3	
		Southwest Cozumel	Playa	3	
			Arrecife	3	
	Impactado	Cozumel	Playa	3	
			Arrecife	3	
		Cancun	Playa	3	
			Arrecife	3	
		Playa del Carmen	Playa	3	
			Arrecife	3	
	Belize	Control	St. George's Cay	Playa	3
				Arrecife	3
Goff's Cay			Playa	3	
			Arrecife	3	
Impactado		San Pedro	Playa	3	
			Arrecife	3	
		Caye Caulker	Playa	3	
			Arrecife	3	
		Placencia	Playa	3	
			Arrecife	3	
Honduras		Control	Camp Bay	Playa	3
				Arrecife	3
	Turtle Harbour		Playa	3	
			Arrecife	3	
	Impactado	West End	Playa	3	
			Arrecife	3	
		West Bay	Playa	3	
			Arrecife	3	
		Utila Town	Playa	3	
			Arrecife	3	
	Total De Sitios Por Monitoreo				90
	Total De Sitios Arrecifales				45
Total De Sitios De Playa				45	
Total De Sitios Impactados				54	
Total De Sitios Control				36	

Seguridad en campo.

El día de muestreo, se deberá reportar a la organización responsable del monitoreo un plan de contingencia, el cual incluye: los datos de las personas participantes (nombres y apellidos, número de identificación, número de seguro y número de teléfono) en el monitoreo, la descripción de la embarcación (nombre, número de matrícula, puerto de embarque y desembarque, nombres del dueño y del capitán y sus datos de contacto), hora, fecha, lugar donde se hará el monitoreo y un contacto de emergencia para comunicarse en el caso de que la embarcación no llegue a la hora descrita en el plan (Anexo II). Así mismo, cada embarcación debe de contar con un equipo de primeros auxilios, chalecos salvavidas, radio, mantas hipotérmicas y agua/jugos. Finalmente, se deberá dar aviso a las autoridades del AMP no menos de 24 h antes de la salida.

Caracterización del sitio.

Las localidades del presente estudio se seleccionaron basándose en la presencia de arrecifes y playa, como también a la importancia de visitación que tienen. Sin embargo, cada sitio presenta condiciones distintas según su ubicación geográfica, como por ejemplo el tipo de hábitat marino representativo y la velocidad de corrientes marinas. Estos son de vital importancia considerando el transporte y difusión de contaminantes a otras áreas por medio de corrientes marinas (Tabla 3). Esta caracterización se validará en campo empleando la hoja de caracterización de sitio perteneciente al Coastal Zone Management Authority and Institute (CZMAI; Anexo III).

Garantía y control de calidad.

Un paso importante en el monitoreo es comprobar la integridad de las muestras de agua, para lo cual según la *Canadian Council of Ministers of the Environment* (CCME) es necesario tomar muestras de calidad o “blancos”. Las muestras en blanco se pueden usar para determinar si la contaminación podría ingresar a una muestra de agua en el transporte (blanco de disparo) o en todo el proceso de muestreo (campo en blanco). Las muestras en blanco son de utilidad para:

1. Probar la pureza de los conservantes químicos.
2. Verificar la contaminación de los contenedores de muestras, papeles de filtro, equipos de filtración o cualquier otro equipo que se use en la recolección, manipulación o transporte de muestras.
3. Detectar la contaminación que ocurre durante el muestreo.
4. Detectar otros errores sistemáticos y aleatorios que ocurren desde el momento del muestreo hasta el momento del análisis.

Las muestras en blanco generalmente se preparan en el laboratorio y simplemente viajan con las botellas de muestra desde el laboratorio al sitio de la muestra y luego de regreso al laboratorio sin abrirse hasta el momento del análisis (CCME, 2011). La preparación de la muestra en blanco se detalla en la sección de cada parámetro.

Tabla 3. Caracterización de las localidades que se monitorearán en la Fase 1 del proyecto.

País	Localidad	Hábitat Marino Presente	Velocidad Promedio de Corrientes Marinas (m/s)	Fuente
Mexico	Sian Ka'an	Estructura coralina, octocorales y pedacería, pastos marinos, arrecife rocoso y laguna costera	0.31	Cerdeira-Estrada et al., 2018; Tyberghein et al., 2012
	Southwest Cozumel	Estructura coralina	0.85	
	Cancun	Estructura coralina, pastos marinos y macroalgas, tocones y pedacería de coral	0.55	
	Playa del Carmen	Tocones y pedacería de coral, macroalgas, octocorales y corales	0.74	
Belize	St Georges Cay	Parches de arrecife, arrecife somero y pastos marinos	0.10	Tyberghein et al., 2012; Maidens y Burke, 2005
	Goff's Cay	Parches de arrecife, arrecife somero, pastos marinos, canales y crestas	0.11	
	San Pedro	Parches de arrecife, arrecife somero, pastos marinos, canales y crestas	0.12	
	Caye Caulker	Parches de arrecife, arrecife somero, pastos marinos, canales y crestas	0.09	
	Placencia	Parches de arrecife, arrecife somero, pastos marinos, canales y crestas	0.15	
Honduras	Camp Bay	Pavimento con gorgonia y alga turf, parche de arrecife agregado y pastos marinos	0.24	Purkis L., 2016; Tyberghein et al., 2012
	Turtle Harbour	Arrecife agregado, parche de arrecife y laguna y pastos marinos	0.17	
	West End	Pavimento con gorgonia y alga turf	0.22	
	West Bay	Parche de arrecife agregado, pavimento con gorgonia y alga turf	0.22	
	Utila Town	Arrecife agregado, parche de arrecife y pastos marinos	0.15	

Nomenclatura de las muestras.

Tabla 4. Nomenclatura para cada localidad de monitoreo.

Localidad	Sitio	Nomenclatura
Sian Ka'an	Playa	SKP
	Arrecife	SKA
Southwest Cozumel	Playa	SCP
	Arrecife	SCA
Cozumel	Playa	CZP
	Arrecife	CZA
Cancún	Playa	CAP
	Arrecife	CAA
Playa del Carmen	Playa	PCP
	Arrecife	PCA
St. Georges Caye	Playa	SGP
	Arrecife	SGA
Goff's Caye	Playa	GCP
	Arrecife	GCA
San Pedro	Playa	SPP
	Arrecife	SPA
Caye Caulker	Playa	CCP
	Arrecife	CCA
Placencia	Playa	PLP
	Arrecife	PLA
Camp Bay	Playa	CBP
	Arrecife	CBA
Rock Harbor-Turtle Harbor	Playa	RHP
	Arrecife	RHA
West End	Playa	WEP
	Arrecife	WEA
West Bay	Playa	WBP
	Arrecife	WBA
Utila Town	Playa	UTP
	Arrecife	UTA
Muestra en Blanco	Playa	BP
	Arrecife	BA

Las muestras deben de ser identificadas según categorías (Tabla 4): sitio, tipo de análisis y el orden de colecta. Como primer paso para la nomenclatura, se recomienda definir y asignar los caracteres utilizados en cada localidad de colecta. A continuación, en la Tabla 4 se brinda una referencia de la nomenclatura por localidad. Etiquetar las botellas estériles antes de la toma de muestras.

Consecutivamente, cada sitio dentro de la localidad debe de ir acompañado con la numeración "1", "2" y "3" dependiendo de su ubicación geográfica (siempre se deberá mantener siempre el mismo número por sitio de muestreo). Además, se recomienda colocar el tipo de análisis que se procederá luego de la colecta de la muestra:

- "C" = Coliformes
- "E" = Enterococos
- "N" = Nitrato
- "NI" = Nitrito
- "A" = Amoníaco
- "F" = Fósforo
- "I" = Isótopos

Para las muestras de enterococos se toman 3 réplicas por sitio. Por lo cual, en la nomenclatura asigne un número de muestra para indicar la réplica. Por último, asigne la fecha.

Ejemplo

[Letra (localidad), número (sitio), letra (análisis), número (muestras)] + Fecha(dd/mm/aa)

Por ejemplo, las muestras tomadas para enterococos en el primer sitio de arrecife de Utila Town quedará de la siguiente manera:

UTA1E01
01/07/21

Toma de muestras de agua.

Los recolectores de muestras deberán mantener sus manos limpias, usar guantes al momento de tomar las muestras y abstenerse de comer o fumar mientras trabajan con muestras de agua. Los gases de escape y el humo del cigarrillo pueden contaminar las muestras con plomo y otros metales pesados (CCME, 2011).

El procedimiento para tomar la muestra según los *Métodos Estándar para la Examinación de Agua y Aguas Residuales* es el siguiente:

1. Mantener las botellas estériles de 100 mL (previamente etiquetados) en la hielera a una temperatura de $4\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ para su traslado.
2. Usar guantes protectores.
3. Retirar la tapa del recipiente.
4. Enjuagar la botella 3 veces con agua del sitio a muestrear.
5. Tomar el recipiente por la parte inferior y sumergir (boca abajo) aproximadamente 20-30 cm.
6. Girar el recipiente hacía la corriente o las olas apartándolo de la embarcación (Véase Figura 2).
7. Permitir que el agua entre al recipiente por 30 segundos.
8. Tapar el recipiente lleno mientras está sumergido y sacar inmediatamente del mar (se recomienda colocar parafilm en la tapa de la botella para asegurar la muestra).
9. Después de sacar el recipiente del agua, desechar una pequeña porción de la muestra para permitir una mezcla adecuada antes del análisis (EPA, 2009).
10. Colocar la muestra en la hielera sobre el hielo (no sobre el agua del hielo derretido) a una temperatura de $<10\text{ }^{\circ}\text{C}$ y transportar las muestras al laboratorio.
11. Se recomienda tomar 3 muestras de cada sitio como respaldo.

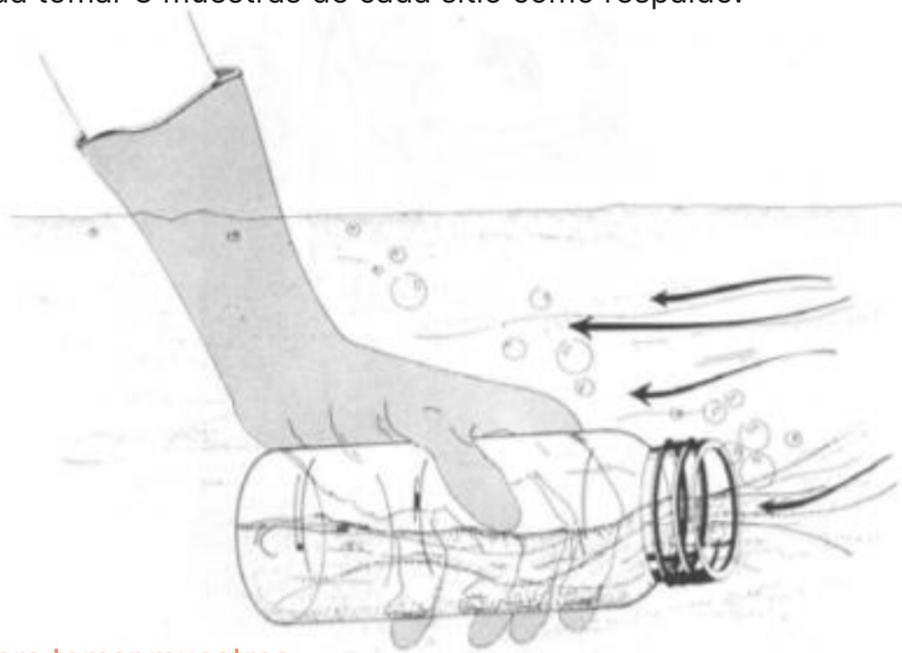


Figura 2. Técnica para tomar muestras en aguas superficiales. Tomado de EPA, 2009.

Tabla 5. Materiales y equipo a utilizar en el monitoreo y en la colecta de patógenos de agua marina en SAM.

Materiales y Equipo	Cantidad por Sitio	Total Sitios SAM
Botellas estériles de 100 mL	4	360
Hieleras	2	180
Bolsas de hielo en cubos	4	360
Hojas de campo en papel impermeable	2	180
Paquete de lapices grafito	1	90
Marcador permanente	2	180
Disco secchi	1	10 (número de socios MAR)
GPS	1	10 (número de socios MAR)
Cámara a prueba de agua (opcional)	1	10 (número de socios MAR)

Protocolo de colecta de patógenos.

Los coliformes fecales y los enterococos son los indicadores más apropiados para determinar la presencia de contaminación de origen fecal en un cuerpo de agua (Herrera & Suárez, 2005). La presencia y el grado de contaminación fecal es un factor importante en la evaluación de la calidad de un cuerpo de agua.

Al examinar muestras de agua se puede detectar presencia de organismos del grupo de las bacterias coliformes proveyendo un indicador de contaminación. Ya que la habilidad de algunos organismos miembros del grupo de las bacterias coliformes de sobrevivir en el agua es limitada, su cantidad puede también ser utilizada para estimar el grado de contaminación fecal reciente. Por otro lado, la medición de enterococos es un indicador específico de contaminación fecal en el agua (Baird et al., 2017) responsable

de la gastroenteritis, su presencia indica una contaminación reciente. Varios estudios han indicado que los enterococos son los mejores indicadores para detectar la presencia de contaminación microbiológica en aguas recreativas (Shibata et al., 2004).

Materiales y equipo.

En la Tabla 5 se detalla el material y equipo necesario en la colecta de muestras para análisis de patógenos por cada sitio de muestreo.



Protocolo de colecta de parámetros biofísicos.

Los parámetros biofísicos son tomados por medio de la sonda multiparamétrica YSI ProDSS. Dicho instrumento es calibrado 1 a 3 días antes del día de muestreo.

Calibración del YSI ProDSS.

Durante la calibración de los parámetros de pH, conductividad y turbidez, se deben tomar en cuenta las siguientes consideraciones (YSI, 2014):

- Asegurar que el vaso de calibración, el protector del sensor y todos los sensores estén limpios.
- Si está utilizando el vaso de calibración, asegurar de instalar el protector del sensor antes de colocar los sensores en el vaso de calibración.
- Utilizar el protector del sensor y el vaso de calibración para la calibración de turbidez y oxígeno disuelto. Las demás calibraciones pueden ser realizadas en otros instrumentos de vidrio.
- Asegurar de utilizar un protector de sonda limpio durante la calibración para evitar la contaminación del entorno de calibración.

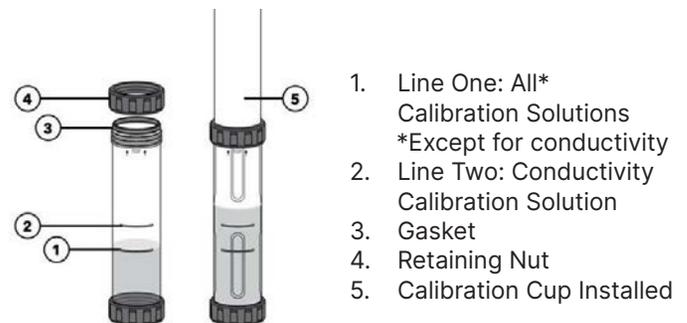
A continuación, seguir los siguientes pasos:

1. Se deberá instalar el sensor limpio y seco y un protector de sensor en el cabezal.*
2. Llenar el vaso de calibración con una cantidad moderada de agua y ajustar el vaso de calibración en el cabezal. Utilizar el agua para enjuagar el vaso y el sensor

que se calibrará. Desechar el agua del enjuague.

3. Enjuagar bien el vaso de calibración con una pequeña cantidad de estándar de calibración para que el sensor se calibre. Desechar el estándar.
4. Volver a llenar el vaso de calibración con estándar de calibración nuevo hasta aproximadamente la primera línea para la calibración de pH y turbidez. Llenar hasta la segunda línea para la calibración de conductividad (Ver Figura 3).**
5. Sumergir los sensores en el estándar y ajustar el vaso de calibración en el cabezal.***
6. Calibrar los sensores.

Figura 3. Volumen estándar de vaso de calibración. Tomado del manual YSI ProDSS, 2018.



*Instalar un tapón de puerto gris en todos los puertos expuestos. Todos los sensores deben tener un sensor o un tapón de puerto instalado.

** Los volúmenes pueden variar. Debe asegurarse que el sensor de temperatura y el sensor que se calibrará estén sumergidos en la solución de calibración, excepto cuando se realice una calibración de saturación de % de oxígeno disuelto.

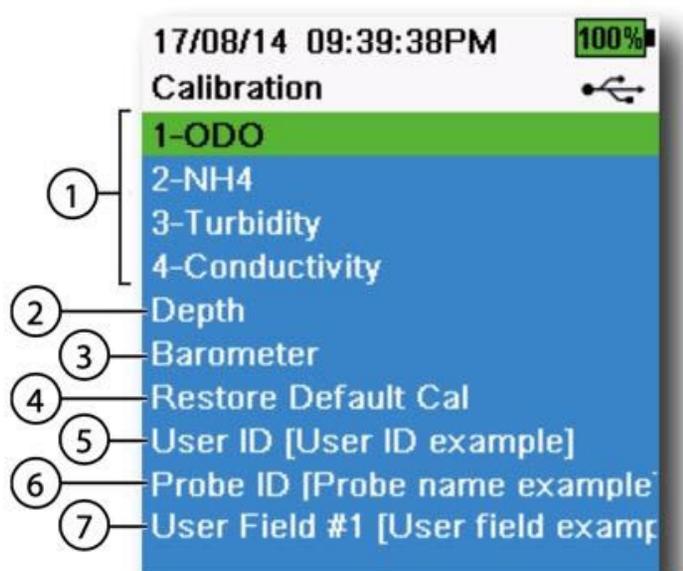
***Tener la precaución de evitar la contaminación cruzada con otros estándares.

****Estas recomendaciones de enjuague solo son pautas sugeridas para la máxima precisión de los datos. Asegúrese de seguir los Procedimientos de operación estándar (SOP, por su sigla en inglés) de su organización para la calibración y operación del instrumento.



Photo By: Antonio Busiello

Figura 4. Menú de calibración. Tomado del manual YSI ProDSS, 2014.



- | | |
|--|---------------|
| 1. Sensors Connected to the Head | 5. User ID |
| 2. Optional Depth Sensor Calibration | 6. Probe ID |
| 3. Barometer Calibration | 7. User Field |
| 4. Restore Default Calibration
(Factory Settings) | |

Menú de calibración:

Seguir las siguientes instrucciones basadas en el manual de YSI ProDSS:

1. Pulsar la tecla Cal para acceder al menú de Calibración (Figura 4). Resaltar un submenú y pulsar la tecla ENTER para ver las opciones del submenú.
2. Los parámetros predefinidos o seleccionados por el usuario se indican entre paréntesis rectos ([]).
3. Consultar en la sección de Calibración los procedimientos específicos de calibración (ver sección anterior).

NOTA: Los sensores conectados se indican según el puerto del cabezal en que están instalados.

NOTA: La ID del usuario, la ID de la sonda y los campos de usuario N.º 1 y N.º 2 deben estar habilitados en el menú de GLP para aparecer en el menú de calibración.

Toma de datos biofísicos *in situ*.

Una vez en el sitio de muestreo, en el YSI ProDSS ir a la opción “Registrar una muestra” y escoger el código del sitio a muestrear. Luego, debe sumergir los sensores 50 cm en el sitio y presionar la opción “Registrar ahora”. Se debe esperar a que los valores se estabilicen y luego proceder a la anotación de los datos de:

Hora, Temperatura, DO - Oxígeno Disuelto, CON - Conductividad, SAL - Salinidad, pH, CHL - Clorifila y PE - Total Algae-Phycoerythrin/Algas Totales-Ficoeritrina.

Los valores se deben registrar 3 veces en cada sitio (tanto en el YSI como en la hoja de datos). De ser posible, para los sitios con una profundidad mayor o igual a 6 pies tomar también los datos biofísicos a dicha profundidad, sumergiendo el sensor lo más cerca posible del sustrato.

Tabla 6. Materiales a utilizar en la colecta de nutrientes en agua marina en el sam.

Materiales	Cantidad por Sitio	Total Sitios SAM
Botellas estériles de 100 m	4	360
Hieleras	2	180
Bolsas de hielo en cubos	4	360
Hojas de campo en papel impermeable	2	180
Paquete de lápices grafito	1	90
Marcador permanente	2	180

Protocolo de colecta de nutrientes.

La colecta de nutrientes se deberá realizar exclusivamente en los sitios de playa, ya que los arrecifes tienden a ser oligotróficos y estos nutrientes son consumidos muy rápidamente, dificultando su detección. Los parámetros que se tomarán serán el amonio (un contaminante omnipresente), nitrato, nitrito y fósforo total (Baird et al., 2017; O'Dell, 1993).

Amoniacó (NH_3)

- Tomar una muestra de agua de 250 mL (el volumen colectado debe de ser suficiente para asegurar una representatividad de la muestra), el envase para la muestra debe de estar previamente etiquetado y esterilizado.
- Minimizar la exposición de las muestras al aire tanto como sea posible (EPA, 2001). Los resultados más fiables se obtienen con muestras frescas.
- Las muestras se deben analizarse dentro de las 24 h posteriores a la recolección.
- Refrigerar sin acidificar a 4 °C las muestras. Para una preservación de hasta 28 días, congelar a -20 °C sin acidificar o conservar las muestras acidificándolas a pH 2 y almacenándolas a 4 °C.
- Si se usa preservación ácida, se deberá neutralizar las muestras con NaOH o KOH inmediatamente, antes de hacer la determinación.

PRECAUCIÓN: Aunque la acidificación es adecuada para ciertos tipos de muestras, produce interferencias cuando hay amonio intercambiable presente en sólidos sin filtrar.

TIPO DE ENVASE: Las muestras se deberán recolectar en frascos de boca ancha de plástico o vidrio con un mínimo posible de espacio de aire dentro de la muestra (EPA, 2001).

Protocolo para la obtención de amoníaco en el laboratorio.

1. Cargar y ejecutar el método AC2012.
2. Llenar un vial AQUAfast redondo limpio de 24 mm, cat. No. AC2V24, con 10 mL de muestra. Cerrar el vial firmemente con la tapa. Limpiar el exterior del vial.
3. Colocar el vial en el soporte de la cámara de muestras y cerrar la puerta de la cámara.
4. Tocar la tecla de función "Blank" para medir el blanco.
5. Abrir la puerta de la cámara de muestras y retirar el vial del soporte.
6. Agregar la tableta de amoníaco n. 1 directamente del paquete al vial. Triturar la tableta con una varilla de agitación limpia.
7. Agregar la tableta de amoníaco n. 2 directamente del paquete a la misma muestra en el vial. Triture la tableta con una varilla de agitación limpia.
8. Cerrar bien el vial con la tapa y girar varias veces hasta que las tabletas estén disueltas. Limpiar el exterior del vial.
9. Esperar un período de reacción de 10 minutos.
10. Colocar el vial en el soporte de la cámara de muestras y cerrar la puerta de la cámara.
11. Tocar la tecla de función "Sample" para mostrar el resultado en mg/L de amoníaco como N.

NOTAS:

- Este método es una adaptación de Standard Methods 4500-NH₃ F, utilizado por BICA.
- El siguiente método requiere el kit de análisis comercial AC2012.
- Este método tiene un rango de detección de 0.02 – 1 mg/L N.
- El kit comercial AC2012 es compatible con los siguientes instrumentos: Orion AquaMate Vis and UV-Vis Spectrophotometers, Orion AQUAfast AQ4000 Colorimeter, Orion AQUAfast.





Control de calidad.

Método en blanco: Seguir el mismo procedimiento previamente descrito en la sección de métodos para obtención de amoníaco en el laboratorio, pero utilizar agua ultrapura en lugar de muestra. Los resultados no deben ser mayores a la mitad del límite reportable ($>1/2$ MRL). En este caso los resultados no deben de ser mayores a 0.01 mg /L N. Muestras con un blanco contaminado deben de ser re-analizadas. Realizar el método en blanco antes de analizar las muestras.

Laboratorio fortificado en blanco (LFB): Seguir el mismo procedimiento previamente descrito en la sección de métodos para obtención de amoníaco en el laboratorio, pero utilizar agua ultrapura a la cual se le ha agregado una concentración de analito conocido. La concentración debe de ser al menos 10 veces el nivel de detección (por sus siglas en inglés MDL, Method Detection Limit) o límite reportable o niveles máximos de residuos (por sus siglas en inglés MRL, Maximum Residue Levels). Para esta prueba, utilizar una solución de 0.2 mg/L N. Para preparar esta solución, diluir 0.7638 mg NH_4Cl en 1 L de agua ultrapura. Procesar la solución como una muestra normal.

Matriz fortificada de laboratorio (LFM): Seguir el mismo procedimiento previamente descrito en la sección de métodos para obtención de amoníaco en el laboratorio, pero utilizar una muestra (no agua destilada) a la cual se le ha agregado una concentración de analito conocido. La concentración de analito agregada debe de ser igual al LFB, en este caso 0.2 mg/L N. Preparar la solución de la misma manera: diluir 0.7638 mg NH_4Cl en 1 L de muestra (no agua destilada). De no tener suficiente muestra, ajustar el volumen para mantener una concentración de 0.2 mg/L N. De manera separada determinar la concentración de la muestra previo a la adición del reactivo y corregir los resultados en base a la concentración de fondo.

Nitrito (NO_2).

- Tomar una muestra de agua de 250 mL (el volumen colectado debe ser suficiente para asegurar una representatividad de la muestra) el envase para la muestra debe de estar previamente etiquetado y esterilizado.
- Nunca usar preservación ácida para las muestras que se van a analizar en busca de NO_2 .
- Realizar la determinación de inmediato en muestras frescas para evitar la conversión bacteriana de NO_2 en NO_3 o NH_3 .
- Para una preservación a corto plazo de 1 a 2 días, congelar a -20°C o almacenar a 4°C .

Protocolo para la obtención de nitrito en el laboratorio.

1. Cargar y ejecutar el método AC2046.
2. Llenar un vial AQUAfast redondo limpio de 24 mm, cat. No. AC2V24, con 10 mL de muestra. Cerrar el vial firmemente con la tapa. Limpiar el exterior del vial.
3. Colocar el vial en el soporte de la cámara de muestras y cerrar la puerta de la cámara.
4. Tocar la tecla de función "Blank" para medir el blanco.
5. Abrir la puerta de la cámara de muestras y retirar el vial del soporte.
6. Agregar una tableta de nitrito LR directamente del paquete al vial. Triturar la tableta con una varilla de agitación.
7. Cerrar bien el vial con la tapa y girar varias veces hasta que la tableta esté disuelta. Limpiar el exterior del vial.
8. Esperar un período de reacción de 10 minutos.
9. Colocar el vial en el soporte de la cámara de muestras y cerrar la puerta de la cámara.
10. Presionar la tecla de función "Sample" para mostrar el resultado en mg/L de nitrito como N.

NOTAS:

- Este método es una adaptación de Standard Methods 4500- NO_2 B, utilizado por BICA.
- El siguiente método requiere el kit de análisis comercial AC2046.
- Este método tiene un rango de detección de 0.01 – 0.5 mg/L N.
- El kit comercial AC2046 es compatible con los siguientes instrumentos: Orion AquaMate Vis and UV-Vis Spectrophotometers, Orion AQUAfast AQ4000 Colorimeter, Orion AQUAfast.

Control de calidad.

Las muestras no deben de preservarse en ácido ya que esto causa que se transformen en Nitrato. Se aplicarán tres diferentes métodos de control de calidad:

Método en blanco: Seguir el mismo procedimiento previamente descrito en la sección de métodos para obtención de nitrito en el laboratorio, pero utilizar agua ultrapura en lugar de muestra. Los resultados no deben ser mayores a la mitad del límite reportable ($>1/2$ MRL). En este caso los resultados no deben de ser mayores a 0.005 mg/L N. Muestras con un blanco contaminado deben de ser re-analizadas. Realizar el método en blanco antes de analizar las muestras.

Laboratorio fortificado en blanco (LFB): Seguir el mismo método descrito previamente en la sección de métodos para obtención de nitrito en el laboratorio, pero utilizar agua ultrapura a la cual se le ha agregado una concentración de analito conocido. La concentración debe de ser al menos 10 veces el nivel de detección (MDL) o límite reportable (MRL). Para esta prueba, utilizar una solución de 0.1 mg/L N. Para preparar esta solución, diluir 0.4926 mg NaNO_2 en 1 L de agua ultrapura. Procesar la solución como una muestra normal.

Matriz fortificada de laboratorio (LFM): Seguir el mismo método descrito anteriormente en la sección de métodos para obtención de nitrito en el laboratorio, pero utilizar una muestra (no agua destilada) a la cual se le ha agregado una concentración de analito conocido. La concentración de analito agregada debe de ser igual al LFB, en este caso 0.1 mg/L N. Preparar la solución de la misma manera: diluir 0.4926 mg NaNO_2 en 1 L de muestra (no agua destilada). De no tener suficiente muestra, ajustar el volumen para mantener una concentración de 0.2 mg/L N. De manera separada determinar la concentración de la muestra previo a la adición del reactivo y corregir los resultados en base a la concentración de fondo.

Nitrato (NO_3).

- Tomar una muestra de agua de 250 mL (el volumen colectado debe de ser suficiente para asegurar una representatividad de la muestra), el envase para la muestra debe de estar previamente etiquetado y esterilizado.
- Recoger las muestras en recipientes de polietileno, fluoropolímero o vidrio. Si es posible, inicie los análisis de NO_3 inmediatamente después del muestreo.
- Las muestras se pueden almacenar sin acidificar hasta 48 horas a 6°C. La acidificación convierte cualquier nitrito (NO_2) en NO_3 . Como resultado, los valores de NO_3 son la suma de NO_3 y NO_2 .
- Si las muestras se deben preservar por un periodo prolongado estas deben almacenarse durante 48 h, acidificar a pH 2 con ácido sulfúrico o clorhídrico (según el método) y refrigerar a 6 °C (o de 2 a 6 °C para muestras de conformidad con SDWA; U.S. Safe Drinking Water Act) hasta 28 días. Las muestras cloradas son estables durante al menos 14 días sin conservación de ácido.

Protocolo para la obtención de nitrato en el laboratorio.

1. Cargar y ejecutar el método ACR007.
2. Abrir un vial de reacción de 16 mm (Reactivo A) y agregar 1 mL de agua desionizada (este es el vial en blanco).
3. Abrir un segundo vial de reacción de 16 mm (Reactivo A) y agregar 1 mL de muestra (este es el vial de muestra).
4. Agregar el contenido de un paquete de polvo cromotrópico de nitrato directamente del empaque en cada frasco.
5. Cerrar bien los viales con los tapones invertir suavemente unas 10 veces para mezclar el contenido. Algunos sólidos pueden no disolverse. Limpiar el exterior de los viales.
6. Esperar un período de reacción de 5 minutos.
7. Colocar el vial en blanco en el soporte de la cámara de muestras y cerrar la puerta de la cámara.
8. Tocar la tecla de función "Blank" para medir el blanco.
9. Abrir la puerta de la cámara de muestras. Retirar el vial en blanco del soporte.
10. Colocar el vial de muestra en el soporte de la cámara de muestra y cerrar la puerta de la cámara.
11. Tocar la tecla de función "Sample" para mostrar el resultado en mg / L de nitrato como N.

NOTAS:

- El siguiente método requiere el kit de análisis comercial ACR007.
- Este método tiene un rango de detección de 1 – 30 mg/L N.
- El kit comercial ACR007 es compatible con los siguientes instrumentos: Orion AquaMate Vis and UV-Vis Spectrophotometers, Orion AQUAfast AQ3700 Colorimeter.

Control de calidad.

Laboratorio fortificado en blanco (LFB): Seguir el mismo método descrito en la sección anterior en la sección de métodos para obtención de nitrato en el laboratorio, pero utilizar agua ultrapura a la cual se le ha agregado una concentración de analito conocido. La concentración debe de ser al menos 10 veces el nivel de detección (MDL) o límite reportable (MRL). Para esta prueba, utilizar una solución de 10 mg/L N. Para preparar esta solución, diluir 72.182 mg de KNO_3 en 1 L de agua ultrapura. Procesar solución como una muestra normal.

Matriz fortificada de laboratorio (LFM): Seguir el mismo procedimiento previamente descrito en la sección de métodos para obtención de nitrato en el laboratorio, pero utilizar una muestra (no agua destilada) a la cual se le ha agregado una concentración de analito conocido. La concentración de analito agregada debe de ser igual al LFB, en este caso 10 mg/L N. Preparar la solución de la misma manera: diluir 72.182 mg KNO_3 en 1 L de muestra (no agua destilada). De no tener suficiente muestra, ajustar el volumen para mantener una concentración de 10 mg/L N. De manera separada determinar la concentración de la muestra previo a la adición del reactivo y corregir los resultados en base a la concentración de fondo.

Fósforo (P).

- Tomar una muestra de agua de 250 mL (el volumen colectado debe de ser suficiente para asegurar una representatividad de la muestra), el envase para la muestra debe de estar previamente etiquetado, esterilizado y enjuagado con una solución de ácido clorhídrico al 10% para evitar que el fósforo se adhiera a las paredes del envase.
- Si se van a diferenciar las formas de fósforo disuelto, filtrar la muestra inmediatamente después de la recolección.
- La muestra debe congelarse inmediatamente a 10 ° C o menos. En caso de no tener una refrigeración adecuada conservada con HgCl_2 , se pueden agregar 40 mg HgCl_2 / L a las muestras (Wong et al., 2017).
- Si va a determinar fósforo total, agregar H_2SO_4 o HCl a pH 2 y enfriar a 4 °C, o congelar sin adiciones.
- No almacenar muestras que contengan bajas concentraciones de fósforo en botellas de plástico a menos que se mantengan en estado congelado porque los fosfatos pueden absorberse en las paredes de las botellas de plástico.
- Enjuagar todos los recipientes de vidrio con HCl diluido caliente, luego enjuagar varias veces con agua reactiva. No utilizar nunca detergentes comerciales que contengan fosfato para limpiar el material de vidrio utilizado en el análisis de fósforo total. Se pueden utilizar técnicas de limpieza más enérgicas.

PRECAUCIÓN: HgCl_2 es una sustancia peligrosa; tomar las precauciones necesarias para su eliminación. De no ser necesario, no se recomienda el uso de HgCl_2 . No agregar ácido ni ChCl_3 como preservante cuando se vayan a determinar las formas de fósforo.



Protocolo para la obtención de fósforo en el laboratorio.

1. Abrir un tubo de digestión de reactivo ácido $\text{PO}_4\text{-P}$ de 16 mm y agregue 5 mL de muestra.
2. Agregar el contenido de un paquete de polvo de persulfato de potasio F10 directamente del paquete al frasco. Use un embudo para agregar el reactivo.
3. Cerrar bien el vial con la tapa e invierta el vial varias veces para mezclar el contenido.
4. Calentar el vial durante 30 minutos en el reactor precalentado a una temperatura de 100 °C. **PRECAUCIÓN:** El vial estará caliente. Retirar el vial del reactor y dejarlo enfriar a temperatura ambiente.
5. Abrir el vial de digestión enfriado y agregue 2 mL de solución de hidróxido de sodio 1.54 normal al frasco.
6. Cerrar bien el vial con la tapa e invertir suavemente el vial varias veces para mezclar el contenido. Limpiar el exterior del vial.
7. Cargar y ejecutar el método ACD095 en el espectrofotómetro.
8. Colocar el vial en el soporte de la cámara de muestras y cerrar la puerta de la cámara.
9. Tocar la tecla de "Blank" para medir el blanco.
10. Abrir la puerta de la cámara de muestras. Retirar el vial del soporte.
11. Agregar el contenido de un Phosphate Rgt. F10 Powder Pack directamente del empaque al vial. Usar un embudo para agregar el reactivo.
12. Cerrar el vial firmemente con la tapa y agitar el vial durante 10-15 segundos para mezclar el contenido. El reactivo no se disolverá por completo. Limpiar el exterior del vial.
13. Esperar un período de reacción de 2 minutos.
14. Colocar el vial en el soporte de la cámara de muestras y cerrar la puerta de la cámara.
15. Tocar la tecla de función "Sample" para mostrar el resultado en mg/L de fosfato total como fósforo.

NOTAS:

- Este método es una adaptación de Standard Methods 4500-P E., utilizado por BICA.
- El siguiente método requiere el kit de análisis comercial ACD095.
- Este método tiene un rango de detección de 0.02 – 1.1 mg/l P.
- El kit comercial ACD095 es compatible con los siguientes instrumentos: Orion AquaMate Vis and UV-Vis Spectrophotometers, Orion AQUAfast AQ3700 Colorimeter.

Control de calidad.

Las muestras deben de ser colectadas en botes previamente enjuagados con una solución de 10% HCl para evitar que el fósforo se adhiera a las paredes del frasco. Se aplicarán 3 diferentes métodos de control de calidad:

Método en blanco: Seguir el mismo procedimiento previamente descrito en la sección de métodos para obtención de fósforo en el laboratorio, pero utilizar agua ultrapura en lugar de la muestra. Los resultados no deben ser mayores a la mitad del límite reportable ($>1/2$ MRL). En este caso los resultados no deben de ser mayores a 0.01 mg/L P. Muestras con un blanco contaminado deben de ser re-analizadas. Realizar el método en blanco antes de analizar las muestras.

Laboratorio fortificado en blanco (LFB): Seguir el mismo método descrito previamente en la sección de métodos para obtención de fósforo en el laboratorio, pero utilizar agua ultrapura a la cual se le ha agregado una concentración de analito conocido. La concentración debe de ser al menos 10 veces el nivel de detección (MDL) o límite reportable (MRL). Para esta prueba, utilizar una solución de 0.2 mg/L P. Para preparar esta solución, diluir 0.8787 mg de KH_2PO_4 en 1 L de agua ultrapura. Procesar solución como una muestra normal.

Matriz fortificada de laboratorio (LFM): Seguir el mismo método descrito anteriormente en la sección de métodos para obtención de fósforo en el laboratorio, pero utilizar una muestra (no agua destilada) a la cual se le ha agregado una concentración de analito conocido. La concentración de analito agregada debe de ser igual al LFB, en este caso 0.2 mg/L. Preparar la solución de la misma manera: diluya 0.8787 mg de KH_2PO_4 en 1 L de muestra (no agua destilada). De no tener suficiente muestra, ajustar el volumen para mantener una concentración de 0.2 mg/L P. De manera separada determinar la concentración de la muestra previo a la adición del reactivo y corregir los resultados en base a la concentración de fondo.



Protocolo para colecta de isótopos.

El siguiente protocolo ha sido adaptado de Dustan, 2021. Dado que no se tiene el conocimiento claro de cuándo se reiniciará el turismo, el diseño presenta un esquema que permite muestrear a una escala fina y luego elegir muestras que reflejen la naturaleza temporal del reinicio del mismo (P. Dustan comunicación personal).

Tabla 7. Materiales y equipo para utilizar en la colecta de isótopos en agua marina en el sam.

Materiales	Cantidad por Sitio	Cantidad Total
Recipientes estériles pequeños	4	360
Rollo de papel aluminio	2	180
Caja de guantes	1	90
Hojas de campo en papel impermeable	2	180
Paquete de lápices grafito	1	90
Marcador permanente	2	180

Colecta.

- Las muestras se recolectarán usando guantes, para no contaminar ni transferir nitrógeno a las muestras de ninguna manera.
- La temporalidad de colecta se definirá una vez que se haya hecho la caracterización de los sitios de muestreo. Tener cuidado de seleccionar plantas individuales que reflejen un crecimiento fresco durante el período de muestreo. Tomar muestras de pastos marinos (*Thalassia* spp.) en los sitios costeros y macroalgas verdes (*Halimeda* spp.) en los sitios de arrecife.
- En general, las plantas deben estar lo suficientemente separadas para asegurar que cada talo ("hoja") sea de una planta diferente. Colecte diez (10) talos (1-2 cm de ancho) en cada sitio. Cada sitio contará con 3 réplicas, agrupar 3 talos para conformar una réplica.
- Limpiar cualquier residuo sobrante de cada muestra antes de guardarla en un recipiente pequeño para evitar daños físicos. Una vez fuera del agua, enjuagar las muestras con agua destilada para eliminar cualquier residuo, pequeños organismos incrustantes u otras impurezas. Si no dispone de agua destilada limpia, utilizar el agua de mar más limpia que pueda obtener. Todas las muestras deben lavarse en la misma agua para garantizar que todas estén expuestas a las mismas condiciones. Nuevamente, las muestras se manipularán con el uso de guantes para evitar la contaminación.
- Después de enjuagar, secar las hojas con una toalla de papel. Luego colocar las hojas en un cuadrado de papel de aluminio doblado. El talo se almacena plano sobre papel de aluminio (consulte las instrucciones a continuación). Fotografiar cada muestra incluyendo una escala y la etiqueta de la muestra para luego tomar las medidas morfométricas.
- Las muestras se deben secar hasta que queden "crujientes" en un deshidratador de alimentos durante un período de 6 a 12 horas. Una olla arrocera o un horno caliente pueden ser suficientes si las temperaturas no superan los ~ 50-60 °C. Almacenar las muestras en un ambiente seco, antes de enviarlas al laboratorio para su análisis.

Manipulación de papel de aluminio para evitar la contaminación.

- Usar guantes de nitrilo o látex para evitar la contaminación.
- Desenrollar una hoja de aluminio aproximadamente 50 cm con la superficie interior (lado más limpio) hacia arriba como superficie de trabajo.
- Desenrollar los trozos del talo más cortos para cortarlos en cuadrados (~ 15×15 cm) y colocarlos en la lámina de la superficie de trabajo con el interior hacia arriba.
- Doblar la lámina de la superficie de trabajo en un sobre pequeño para guardar los cuadrados cortados.
- Colocar un solo talo en un cuadrado, doblar ligeramente para permitir que se produzca la deshidratación.
- Deshidratar la muestra, luego apretar el pliegue para almacenarla.
- Agrupar las colecciones en pequeños “sobres” de aluminio e incluya una etiqueta en el interior, siguiendo la nomenclatura mencionada previamente en la sección de Nomenclatura de las muestras.
- Escribir la etiqueta con tinta permanente en la etiqueta de papel, así como con un marcador permanente en el exterior de cada paquete de papel de aluminio.
- Almacenar los paquetes de muestra en un recipiente con control de humedad, un frasco grande con desecante, en una habitación con aire acondicionado para mantenerlos secos.
- Las muestras serán transportadas al laboratorio para su análisis.

Análisis de isótopos estables.

Las muestras se enviarán a Estados Unidos para ser analizadas, y se obtendrá: concentraciones de nutrientes tisulares $\delta^{13}\text{C}$, $\delta^{15}\text{N}$, % N y C: N.

Registro de información y base de datos.

Ingresar la información recopilada a una hoja de cálculo en Excel prediseñada para las necesidades del proyecto. La hoja de cálculo se subirá al sitio de almacenamiento drive para el acceso de todos. Además, se mantendrán 2 copias en físico para seguridad de los datos.



Bibliografía.

Aronson, R., Bruckner, A., Moore, J., Precht, B., Weil, E., 2008. *Acropora cervicornis*. The IUCN Red List of Threatened Species 2008. IUCN 8235.

Baird, R., Eaton, A.D., Rice, E.W., Bridgewater, L., 2017. *Standard methods: For the examination of water and waste water*, 23rd edit. ed, American Public Health Association. Washington, DC. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(90\)90598-4](https://doi.org/10.1016/0003-2697(90)90598-4)

CCME, 2011. *Protocols manual for water quality sampling in Canada*. Protocols Manual For Water Quality Sampling in Canada.

Cerdeira-Estrada, S., Martínez-Clorio, M.I., Rosique-De La Cruz, L.O., Gonzales-Posada, A.M., Uribe-Martínez, A., Dubois, N., Garza-Pérez, J.R., Álvarez-Filip, L., Cruz-López, M.I., 2018. Benthic Coverage of the Marine Ecosystems of the Mexican Caribbean: Cabo Catoche- Xcalak 2018 [WWW Document]. *Remote Sens. Ocean. Sea Ice, Coast. Waters, Large Water Reg.* 2011. <https://doi.org/10.1117/12.898652>

Dustan, P. (2021). *Capitalizing on the COVID-19-Pause to Assess the Contribution of Tourism Sewage to Coral Reefs: A Research Proposal to the Waitt Foundation*.

Epa, 2009. Method 1106. 1: Enterococci in Water by Membrane Filtration Using membrane- Enterococcus-Esculin Iron Agar.

Herrera, A., Suárez, P., 2005. Bacterial indicators as tools to measure the environmental quality of coastal water [WWW Document]. *Interciencia*. URL http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0378-18442005000300011 (accessed 5.25.21).

Maidens, J., Burke, L., 2005. *Belize Coastal Threat Atlas*. World Resour. Inst. 20.

Mumby, P.J., Flower, J., Chollett, I., Box, S.J., Bozec, Y., Fitzsimmons, C., Forster, J., Gill, D., Griffith-Mumby, R., Oxenford, H.A., Peterson, A.M., Stead, S.M., Turner, R. a, Townsley, P., Van Beukering, P.J.H., Booker, F., Brocke, H.J., Cabañillas-Terán, N., Canty, S.W.J., Carricart-Ganivet, J.P., Charlery, J., Dryden, C., Van Duyl, F.C., Enríquez, S., Den Haan, J., Iglesias-Prieto, R., Kennedy, E. V, Mahon, R., Mueller, B., Newman, S.P., Nugues, M.M., Cortés Núñez, J., Nurse, L., Osinga, R., Paris, C.B., Petersen, D., Polunin, N.V.C., Sánchez, C., Schep, S., Stevens, J.R., Vallès, H., Vermeij, M.J.A., Visser, P.M., Whittingham, E., Williams, S.M., 2014. Reef monitoring for management. *Towards Reef Resilience and Sustainable Livelihoods a Handbook for Caribbean Coral Reef Managers* Toward 143–161.

McField, M., Kramer, P., Giró-Petersen, A., Soto, M., Drysdale, I., Craig, N., Rueda-Flores, M., 2020. *Mesoamerican Reef Report*. Heal. Reefs Heal. People Initiat. 36.

O'Dell, J.W., 1993. Method 350.1. Determination of Ammonia, Nitrogen by Semi-automated Colorimetry. Purkis L., 2016. Summary report of satellite mapping of morphological and benthic habitats for the Honduran North Shore. *Smithson. Inst.* 1–6.

Shibata, T., Solo-Gabriele, H.M., Fleming, L.E., Elmir, S., 2004. Monitoring marine recreational water quality using multiple microbial indicators in an urban tropical environment. *NIH Public Access* 23, 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2004.04.044>. Monitoring

Tyberghein, L., Verbruggen, H., Pauly, K., Troupin, C., Mineur, F., Clerck, O. De, 2012. Bio-ORACLE: a global environmental dataset for marine species 272–281. <https://doi.org/10.1111/j.1466-8238.2011.00656.x>

Wong, G. T. F., Hou, L. L. T., & Li, K. Y. (2017). Preservation of seawater samples for soluble reactive phosphate, nitrite, and nitrate plus nitrite analyses by the addition of sodium hydroxide. *Limnology and Oceanography: Methods*, 15(3), 320–327. <https://doi.org/10.1002/lom3.10160>

YSI, 2014. *Pro DSS User's Manual*.

Anexos.

ANEXO I. Unidades para cada parámetro.

Parámetro	Unidad de medición
Temperatura	Valores de temperatura superficial en °C
pH	Potencial de hidrógeno
Sólidos suspendidos totales	Concentración de sólidos totales suspendidos en mg/L
Oxígeno disuelto	Concentración de oxígeno disuelto en mg/L
Conductividad	Conductividad con corrección de temperatura en $\mu\text{S/cm}$
Salinidad	Concentración de salinidad en PSU
Turbidez	Valor de turbidez en FNU
Clorofila	Clorofila en mg/L
Enterococos (promedio)	Bacterias de enterococos promedio en NMP/100mL
Coliformes totales	Coliformes totales en NMP/100mL
Nitratos	Nitratos presentes en la muestra en mg/L
Nitritos	Nitritos presentes en la muestra en mg/L
Amoniaco	Subproducto original en aguas residuales humanas en mg/L
Fosfatos Totales	Ortofosfato + polifosfato + compuestos de fósforo orgánico en mg/L
Isotopo: N15	Indica la proporción de nitrógeno en las macroalgas derivadas de las aguas residuales humanas; mide cantidad de N15.

ANEXO II. Hoja de seguridad en campo BICA.

Flotation Plan

Please complete this form before leaving on your boat, leave it with a trusted person who will notify the coast guard and local authorities if you do not return as scheduled, if you are late and it is not an emergency, inform the person with your floating plan to avoid unnecessary search

1. Name of the person presenting this plan: _____
Phone: _____

2. Boat description: Type _____ Registration number: _____ Color: _____
Length: _____ Name: _____

3. Name of person on board: _____ Address: _____
Phone: _____

4. Motor description: Horsepower: _____ # de motores: _____ Fuel capacity: _____

5. Survival equipment on board

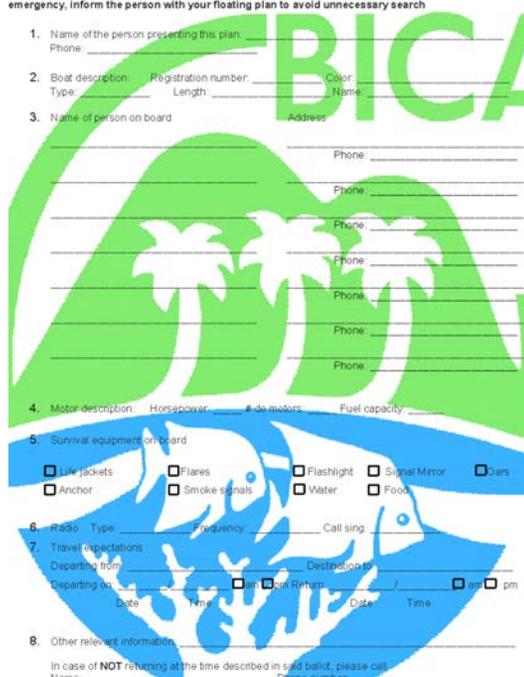
<input type="checkbox"/> Life jackets	<input type="checkbox"/> Flares	<input type="checkbox"/> Flashlight	<input type="checkbox"/> Signal Mirror	<input type="checkbox"/> Vials
<input type="checkbox"/> Anchor	<input type="checkbox"/> Smoke signals	<input type="checkbox"/> Water	<input type="checkbox"/> Food	

6. Radio: Type _____ Frequency: _____ Call sign: _____

7. Travel expectations
Departing from: _____ Destination: _____
Departing on: _____ Date: _____ Time: _____ am pm
Return: _____ Date: _____ Time: _____ am pm

8. Other relevant information: _____

In case of **NOT** returning at the time described in said boat, please call
Name: _____ Phone number: _____



ANEXO III. Hoja de Caractización del sitio de CZMAI.



COASTAL ZONE MANAGEMENT AUTHORITY AND INSTITUTE

Princess Margaret Drive, P.O. Box 1884, Belize City, Belize, Central America
 Tel: 501-223-5739/0719 – Fax: 501-223-5738 – E-mail: coastalplanner@coastalzonebelize.org
 Website: www.coastalzonebelize.org

Appendix 1: Site Characterization Form

Date: _____ Hour: _____ State: _____
 Place: _____ Name of Water Body: _____
 SN: _____

IMPORTANT: Before filling out this form carefully read each of the questions and definitions.

A. BASIC CHARACTERISTICS

1. Mark with an X the type of water body

Sea _____ Lagoon _____ River _____ Stream _____
 Bay _____ Pond _____

2. Specify the coordinates with the precision of tenths of a minute (using GPS procedure)

Latitude: _____ Longitude: _____

3. Briefly indicate the routes of access and if it requires a boat:

4. Indicate the full name of the nearest town. In the event that there is more than one, note those as well:

5. Indicate the means by which you will obtain samples/surveys:

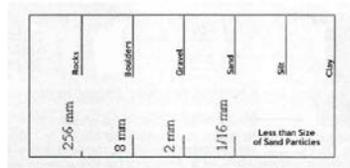
Bridge: _____
 Direct: _____
 Boat: _____

6. Indicate the name(s) of the key person(s) in the area to contact during the calibration of the station. Include address and phone number:



COASTAL ZONE MANAGEMENT AUTHORITY AND INSTITUTE

Princess Margaret Drive, P.O. Box 1884, Belize City, Belize, Central America
 Tel: 501-223-5739/0719 – Fax: 501-223-5738 – E-mail: coastalplanner@coastalzonebelize.org
 Website: www.coastalzonebelize.org



C. CHARACTERISTICS OF WATER BODY

9. At the time of the sampling, point out the conditions of the body of water based on the Beaufort scale, indicate if it was measured or estimated:

0 _____ 1 _____ 2 _____ 3 _____
 4 _____ 5 _____ 6 _____ 7 _____
 8 _____ 9 _____ 10 _____ 11 _____
 12 _____

Beaufort scale is commonly used to characterize conditions in marine water bodies and is based on the speed or force of the wind in such a way that is related with the waves. It comprises 12 values and value mapping is carried out with the altimeter of the speed of the wind with an anemometer and then making knots (1 knot = 1 mph).

Beaufort Scale

Wind Speed (knots)	Description
0	<1 Calm
1	1-3 Light Wind
2	4-7 Light Breeze
3	8-12 Gentle Breeze
4	13-18 Moderate Breeze
5	19-24 Cool Breeze
6	25-31 Strong Breeze
7	32-38 Moderate Gale
8	39-46 Fresh Gale
9	47-54 Strong Gale
10	55-63 Whole Gale
11	64-75 Thunderstorm
12	>75 Hurricane

10. Select the options of fauna which are currently present (select those that apply depending on the type of water body):

Fish _____ Aquatic Birds _____ Larva _____
 Insects _____ Other _____



COASTAL ZONE MANAGEMENT AUTHORITY AND INSTITUTE

Princess Margaret Drive, P.O. Box 1884, Belize City, Belize, Central America
 Tel: 501-223-5739/0719 – Fax: 501-223-5738 – E-mail: coastalplanner@coastalzonebelize.org
 Website: www.coastalzonebelize.org

B. HABITAT CHARACTERISTICS

To make the habitat description, it is necessary to delimit/demarcate the area being characterized. This will cover over 100 metres inland from the shore closest to the point of sampling and the subsequent spot will be appointed "area to be characterized". As extensive as possible, there will be a tour of this area to respond to the information that is requested in the form.

7. Indicate the values of environmental variables of the site at the time of sampling.

Ambient temperature (°C) _____ Relative humidity (%)** _____

Barometric pressure (mmHG)** _____

Note: Based on these three parameters it is possible to concisely know the environmental conditions.

**The temperature indicates the predominant climate at the time of calibration.*

***The water vapor content in the air is called humidity and relative humidity refers to the highest percentage of humidity possible at a temperature and certain pressure, varying from 100% in fog and 10% in desert conditions.*

****Areas of low pressure are associated with the formation of clouds and rains while high pressures are related to clear skies.*

In the event that you do not have the required measuring equipment, alternatively indicate the qualitative environmental conditions that apply (there can be more than one) at the time of the sampling:

Cold _____ Hot/Warm _____ Sunny _____ Cloudy/Rainy _____ Humid _____ Dry _____

8. Indicate the kind of substrate closest to the station:

Rocks _____ Boulders _____ Gravel _____ Sand _____ Silt _____ Clay _____ Mud _____

Construction: Urban: _____ Industrial: _____

Note: In order to be able to differentiate between rocks, sand and fine sediments such as silt or clay an annex table will be used which indicates the size of the sediment, these sizes can be compared through the use of a ruler about 30 cm long that has the millimeters and the centimeters marked. It is difficult to make the measurement with the finer sediments a practical way to differentiate them is by their texture: the sand has a grainy and the silt and clays have a smooth and fine texture.



COASTAL ZONE MANAGEMENT AUTHORITY AND INSTITUTE

Princess Margaret Drive, P.O. Box 1884, Belize City, Belize, Central America
 Tel: 501-223-5739/0719 – Fax: 501-223-5738 – E-mail: coastalplanner@coastalzonebelize.org
 Website: www.coastalzonebelize.org

11. Indicate

the type of
 vegetation of the body of water in the vicinity of the site.

Keip (*Macrocystis* sp), up to 30m _____

Sea Lettuce, (*Ulva* sp), up to 20m _____

Sea Grass, (*Enteromorpha* sp), up to 40cm _____

Sea Weed, (*Sargassum* sp), 20-100cm _____

12. Extra comments. This space is to make any annotation with respect to very particular aspects of the body of water that have not been considered in the previous questions.

D. ALTERATIONS OF THE BODY OF WATER (SIGNS OF CONTAMINATION)

13. Select all signs of water pollution that apply:

Foam _____
 Sewage _____
 Oils and Combustible fuels _____
 Solid Waste _____
 No Contaminants _____

14. Do you smell a bad odour?



COASTAL ZONE MANAGEMENT AUTHORITY AND INSTITUTE

Princess Margaret Drive, P.O. Box 1884, Belize City, Belize, Central America
Tel: 501-223-5739/0719 – Fax: 501-223-5738 – E-mail: coastalplanner@coastalzonebelize.org
Website: www.coastalzonebelize.org

Yes _____ Describe the smell (hydrogen sulphide, sewage, etc.)

15. Colour: Select all the signs of contamination (select those that apply depending on the type of water body)

Black _____ Dark Green _____ Grey _____ Brown _____

Other (Specify what it is) _____ No Color _____

16. Formation of bubbles near the sediment of the water body (If applicable).

Yes _____

No _____

17. Extra comments. This space is to make any annotation with respect to very specific aspects of the alterations of the body of water that has not been considered in the previous questions.-

E. HUMAN ACTIVITIES RELATED TO THE BODY OF WATER

18. Briefly discuss and describe the activities related to the body of water in the vicinity of the site monitoring.

F. LANDSCAPE SKETCH

Hand sketch a map of the monitoring site, taking into account that the sampling site should be the main focus of the area represented in the drawing. Indicate references to help you easily locate site, toggle points of the compass, indicate the road access to the site or indicate the distance to the embarkation site. no measures will be allocated specific for the realization of the drawing, because the morphology and dimensions of the lagoons and bays change along the coastline, the dimensions will be given in accordance with the shape of the lagoon/Bay and the visual scope of the observer.



COASTAL ZONE MANAGEMENT AUTHORITY AND INSTITUTE

Princess Margaret Drive, P.O. Box 1884, Belize City, Belize, Central America
Tel: 501-223-5739/0719 – Fax: 501-223-5738 – E-mail: coastalplanner@coastalzonebelize.org
Website: www.coastalzonebelize.org

G. TAKING PHOTOS

- Take at least four photographs which detail the sampling site as well and its surroundings including points of reference (lamp posts, significant trees).
- If a nearby bridge exists, check the possibility of taking some pictures from the bridge to get a panoramic view of the site, an example would be a bridge over a pond outlet.
- It is recommended that you take pictures from the boat and toward points of reference on the nearest shore. (where applicable)
- It is recommended that the photographer is placed in a safe place (away from the Bank of the stream, not to step on loose stones or sludge) to avoid any mishaps.
- The photos must be taken in good lighting while not facing the sun.



CORAL
REEF ALLIANCE

coral.org | 1.888.CORAL.REEF | info@coral.org