



PROTOCOLO

PARA EL MUESTREO, ANÁLISIS Y ESTUDIO DE LA BIOTA PORTUARIA EN MÉXICO



UANL

Una publicación de la
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DE NUEVO LEÓN

Dr. Santos Guzmán López
Rector

Dr. Juan Paura García
Secretario General

Dr. Jaime Arturo Castillo Elizondo
Secretario Académico

Dr. José Javier Villarreal Tostado
Secretario de Extensión y Cultura

Lic. Antonio Ramos Revillas
Director de Editorial Universitaria

Dr. José Ignacio González Rojas
Director de la Facultad de Ciencias
Biológicas

EDITORIAL UNIVERSITARIA

Padre Mier 909, esquina con Vallarta,
Colonia Centro, Monterrey, Nuevo León,
C.P. 64000
Teléfono (5281) 83294000 Ext. 4111 y 6690
Email: publicaciones@seyc.uanl.mx
www.uanl.mx/publicaciones

Diseño y formación:
Jorge Ortega
Primera edición, 2023
© Universidad Autónoma de Nuevo León

ISBN 978-607-27-2011-4
Publicación electrónica

PROTOCOLO PARA EL MUESTREO, ANÁLISIS Y ESTUDIO DE LA BIOTA PORTUARIA EN MÉXICO



1. FORMA DE CITAR:

Pech D, Tovar-Hernández MA, Bastida-Zavala JR, Carrera-Parra LF, de León-González JA, Delgado-Blas VH, Díaz-Castañeda V, Galván-Villa CM, García-Garza ME, Martínez Arce A, Salazar-Silva P y Salazar-Vallejo SI. 2023. Protocolo para el muestreo, análisis y estudio la biota portuaria en México. Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey, México, 36 páginas. ISBN 978-607-27-2011-4.

DIRECTORIO DE AUTORES

**BASTIDA-ZAVALA J.
ROLANDO**

Laboratorio de Biosistemática de Invertebrados Marinos, Universidad del Mar, Puerto Angel, Oaxaca, México.

✉ rolando_bastida@yahoo.com.mx

**CARRERA-PARRA LUIS
FERNANDO**

Departamento Sistemática y Ecología Acuática, Grupo Estructura y Función del Bentos, El Colegio de la Frontera Sur, Unidad Chetumal, México.

✉ lcarrera@ecosur.mx

**DELGADO-BLAS VÍCTOR
HUGO**

División de Ciencias e Ingeniería, Universidad de Quintana Roo, México.

✉ blas@uqroo.mx

**DE LEÓN-GONZÁLEZ
JESÚS ANGEL**

Laboratorio de Zoología de Invertebrados No Artrópodos, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Nuevo León, México.

✉ jesus.deleongn@uanl.edu.mx

**DÍAZ-CASTAÑEDA
VICTORIA**

Departamento de Ecología Marina, División Oceanología, Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California, México.

✉ vidiaz@cicese.mx

GALVÁN-VILLA CRISTIAN

Laboratorio de Ecosistemas Marinos y Acuicultura, Departamento de Ecología, Universidad de Guadalajara, México.

✉ cristian.galvan@academicos.udg.mx

**GARCÍA-GARZA MARÍA
ELENA**

Laboratorio de Biosistemática, Departamento de Biología Celular y Genética, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Nuevo León, México.

✉ maria.garciagza@uanl.edu.mx

MARTÍNEZ-ARCE ARELY

Departamento Sistemática y Ecología Acuática, Grupo Estructura y Función del Bentos, El Colegio de la Frontera Sur, Unidad Chetumal, México.

✉ armartarce@ecosur.mx

PECH POOL DANIEL

Departamento Ciencias de la Sustentabilidad, Grupo Adaptación Humana y Manejo de Recursos en Ecosistemas Tropicales, El Colegio de la Frontera Sur, Unidad Campeche, México.

✉ dpech@ecosur.mx

SALAZAR-SILVA PATRICIA

Laboratorio de Zoología Marina, Instituto Tecnológico de Bahía de Banderas, Nayarit, México.

✉ patricia.ss@bahia.tecnm.mx

**SALAZAR-VALLEJO
SERGIO I.**

Departamento Sistemática y Ecología Acuática, Grupo Estructura y Función del Bentos, El Colegio de la Frontera Sur, Unidad Chetumal, México.

✉ savs551216@hotmail.com

**TOVAR-HERNÁNDEZ
MARÍA ANA**

Laboratorio de Biosistemática, Departamento de Biología Celular y Genética, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Nuevo León, México.

✉ maria_ana_tovar@yahoo.com

PREFACIO

Las especies acuáticas invasoras son un problema de interés y relevancia mundial, pues éstas constituyen la segunda causa de pérdida de biodiversidad en el planeta, son la primera causa de pérdida de biodiversidad en islas y son la tercera causa de pérdida de biodiversidad en México. Es ya conocido que México es muy vulnerable a la introducción e invasión de especies acuáticas exóticas porque las principales actividades, vectores y rutas de introducción que facilitan su ingreso se encuentran en el país. Estas incluyen la navegación, la acuicultura, la maricultura, la pesca deportiva, los programas sociales y la acuariofilia, aunado a la presencia de canales hechos por el hombre, actividades de investigación y restauración de hábitats acuáticos.

De acuerdo con las estrategias globales y nacionales, se contempla la conservación de los ecosistemas costeros y marinos con manejo y producción sustentable como prioridad, con un enfoque multidimensional e interdisciplinario, con la apropiación social de la ciencia y el acceso universal al conocimiento como vinculantes [Objetivo del Desarrollo Sostenible 14 (Vida Submarina); Convenio Internacional para el control y la gestión del agua de lastre y los sedimentos de los buques; Estrategia Nacional sobre Especies Invasoras, Proyecto Nacional Estratégico de México Sistemas Socioecológicos y Sustentabilidad (PRONACE SSyS)].

Para hacer efectivas esas estrategias, el estudio de las especies invasoras marinas no puede ser de otro modo que a través de la ciencia de incidencia. Por ello, es imprescindible compartir el conocimiento generado en la temática de las especies invasoras marinas en México. Un primer paso es la publicación de este protocolo estandarizado para el muestreo, análisis y estudio de la biota portuaria de México, que es de acceso libre y universal, y que logró reunir los conocimientos e intereses de 12 colegas de 7 instituciones académicas a nivel nacional.

Este protocolo se perfila en ser una guía para todos los colegas interesados en la línea de investigación sobre biota portuaria. Tiene el poder de ser replicado en todos los fila de invertebrados marinos, así como en cualquier país costero de Latinoamérica. Con ello se propone coadyuvar en la capacitación de los colegas, así como en la formación de recursos humanos a través de un enfoque integral al problema de las especies acuáticas invasoras, con visión a ofrecer alternativas que mitiguen los impactos de éstas en México y Latinoamérica. Como cualquier protocolo, está sujeto a mejoras continuas.



María Ana Tovar-Hernández
Facultad de Ciencias Biológicas, UANL

1. INTRODUCCIÓN

En México, es prioritario el estudio de las especies marinas invasoras como se indicó en la Agenda Nacional para la Conservación de los Recursos Naturales. De acuerdo con la Estrategia Nacional sobre Especies Invasoras, la generación de conocimiento es una de las cinco acciones principales para tener una respuesta efectiva a las invasiones biológicas (Comité Asesor Nacional sobre Especies Invasoras, 2010). En el país contamos con el Acuerdo para determinar la lista de las especies exóticas invasoras (Diario Oficial de la Federación, 2016), que incluye algunas especies de invertebrados acuáticos, pero es un instrumento que debe ser actualizado frecuentemente conforme se genere nueva información. Además, México es signatario del Convenio Internacional para el control y la gestión del agua de lastre y los sedimentos de los buques, adoptado en el marco de la Organización Marítima Internacional y decretado en el Diario Oficial de la Federación en 2017.

A pesar de contar con esos instrumentos legales sobre la introducción de especies invasoras, tenemos un rezago en el estudio de la biota portuaria, estimada en unos 40 años y ésta es tan poco conocida que son escasas las listas de especies generadas desde entonces. El "Programa Nacional de Biota Portuaria" propuesto por Salazar-Vallejo et al. (2014) manifestó la necesidad de contar con un protocolo estandarizado para la generación de información taxonómica, ecológica y códigos de barras de ADN para conocer la composición de la biota residente, facilitar la detección de especies

introducidas y estudiar sus cambios a corto y mediano plazo.

Con financiamiento del Fondo Sectorial SEMARNAT-CONACYT A3-S-73811, en este documento se presenta un protocolo de control y aseguramiento de muestras de invertebrados esclerobiontes de marinas turísticas, puertos de altura y cabotaje de México y áreas prioritarias para su conservación. Se propone un diseño para el control y resguardo de muestras biológicas, y para el manejo y custodia de datos que permitan asegurar las acciones de control de la información a lo largo del proceso, desde la toma de muestras hasta el análisis de la información.

2. OBJETIVO

Este protocolo tiene como objetivo establecer un procedimiento para la toma de muestras y datos de campo de la biota portuaria que garantice el estudio de la biodiversidad de anélidos poliquetos nativos en marinas y puertos de México y detectar las especies exóticas e invasoras en sitios prioritarios para su conservación, usando sistemática tradicional, códigos de barras de ADN (barcoding) y metabarcoding.

3. MUESTREO DE BIOTA PORTUARIA

La metodología descrita en este documento está orientada a la obtención de parámetros a monitorear, los sitios de muestreo, la frecuencia de los muestreos, los operadores, las técnicas analíticas, los procedimientos, el almacenamiento y procesamiento de datos, presentación de la información y los criterios adoptados

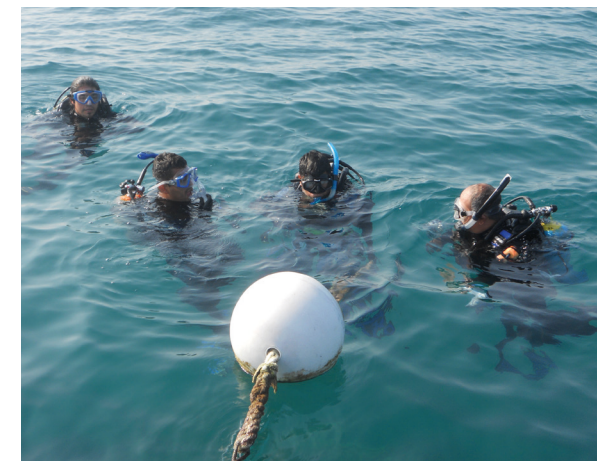
para el aseguramiento de la calidad de los resultados.

3.1 PLANIFICACIÓN PARA LA TOMA DE MUESTRAS

Para los muestreos es indispensable que cada institución participante cuente con una bitácora o diario de campo (libreta de pasta dura cosida) exclusiva para los muestreos del proyecto.

En marinas turísticas y puertos de altura y cabotaje se consideran dos tipos de muestreos: cuantitativos (Q), en andadores (A) para marinas o en boyas (B) para puertos, y muestreos selectivos (S). Además, en cada marina turística se tomará una muestra de un andador (A) para el análisis de metabarcoding (M). En áreas naturales protegidas (ANPs) solo se consideran muestreos selectivos (S).

Código por tipo de muestreo		Código por sustrato	
Q:	Cuantitativo	A:	Andador (marinas)
S:	Selectivo	B:	Boya (puertos)
M:	Metabarcoding		



A continuación, se presentan las marinas, puertos y ANPs a estudiar en el marco del proyecto SEMARNAT-CONACYT A3-S-73811, con sus respectivos códigos por tipo de muestreo. Estos códigos serán usados como base, agregando fecha y número de réplica o muestra según lo indicado en el **Anexo 1** para la elaboración del identificador único.

Códigos			
Marinas	Muestreo cuantitativo	Muestreo metabarcoding	Muestreo selectivo
Marina AquaWorld Cancún	QR-MA-A-Q	QR-MA-A-M	QR-MA-S
Marina Cantamar La Paz	CLP-A-Q	CLP-A-M	CLP-S
Marina Chahué Huatulco	HUX-A-Q	HUX-A-M	HUX-S
Marina Country Club Campeche	CAM-MP-A-Q	CAM-MP-M	CAM-MP-S
Marina Ensenada	ENS-A-Q	ENS-A-M	ENS-S
Marina Fonatur La Paz	FLP-A-Q	FLP-A-M	FLP-S
Marina La Cruz de Huanacaxtle	NAY-A-Q	NAY-A-M	NAY-S
Marina Los Cabos	MLC-A-Q	MLC-A-M	MLC-S
Marina Mazatlán	MZT-A-Q	MZT-A-M	MZT-S
Marina Punta Norte Cancún	—	—	QR-MPN-S
Marina Santa Rosalía	SAR-A-Q	SAR-A-M	SAR-S
Marina Terminal San Francisco de Campeche	CAM-PS-A-Q	CAM-PS-A-M	CAM-PS-S
Marina Topolobampo	TOP-A-Q	TOP-A-M	TOP-S
Marina Veramar Veracruz	VER-MV-A-Q	VER-MV-M	VER-MV-S

Códigos			
Puertos	Muestreo cuantitativo	Muestreo metabarcoding	Muestreo selectivo
ASIPONA El Sauzal	SAU-A-Q y SAU-B-Q	SAU-M-M	SAU-S
ASIPONA Ensenada	ENS-B-Q	ENS-B-M	ENS-S*
ASIPONA La Paz	LAP-B-Q	LAP-B-M	LAP-S
ASIPONA Manzanillo	MAN-A-Q y MAN-B-Q	MAN-A-M	MAN-S
ASIPONA Mazatlán	MZT-B-Q	MZT-B-M	MZT-S
ASIPONA Puerto Vallarta	PVA-B-Q	PVA-B-M	PVA-S
ASIPONA Salina Cruz	SCX-B-Q	SCX-B-M	SCX-S
ASIPONA San Felipe	SNF-A-Q y SNF-B-Q	SNF-B-M	SNF-S
ASIPONA Topolobampo	TOP-B-Q	TOP-B-M	TOP-S
ASIPONA Veracruz	VER-B-Q	VER-B-M	VER-S
Puerto de Lerma	CAM-PL-B-Q	CAM-PL-B-M	CAMP-PL-S

Códigos			
ANPs	Muestreo cuantitativo	Muestreo metabarcoding	Muestreo selectivo
APFF Isla Cerralvo	—	—	CERR-S
RB Bahía de los Angeles	—	—	BLA-S
RB Marismas Nacionales	—	—	MANA-S
PN Bahía de Loreto	—	—	LOR-S
PN Islas Marietas	—	—	ISMA-S
PN Punta Nizuc	—	—	QR-PN-S
PN Isla Sacrificios	—	—	VER-IS-S

*A partir de esta línea los códigos se repiten con los muestreos selectivos de marinas, por lo que se debe asegurar el uso de un número consecutivo para identificar claramente las muestras que provienen de marinas de aquellas de puertos (ver detalles en el **Anexo 1** sobre el identificador único).

Sin embargo, si en un futuro se cuenta con la oportunidad de estudiar otros puertos de altura, a continuación se proponen los siguientes códigos de tres letras, siguiendo primariamente los códigos IATA en los casos en los que así aplique:

Puertos	Código IATA o similar
ASIPONA Acapulco	ACA
ASIPONA Altamira	ATM
ASIPONA Coatzacoalcos	COA
ASIPONA Dos Bocas	DSB
ASIPONA Guaymas	GYM
ASIPONA Lázaro Cárdenas	LZC
ASIPONA Progreso	PRO
ASIPONA Puerto Chiapas	PCH
ASIPONA Tampico	TAM
ASIPONA Tuxpan	TUX

4. MUESTREOS CUANTITATIVOS

4.1 MARINAS TURÍSTICAS

Estos muestreos se realizarán en los andadores (plataformas o muelles flotantes) presentes en las marinas turísticas (Figura 1). Son estructuras flotantes por lo que el agua marina siempre se encuentra al mismo nivel; la mayoría están cubiertas con una capa gruesa de concreto marino o de fibra de vidrio. En consecuencia, el muestreo puede hacerse a cualquier hora del día, pues no está sujeto al régimen de mareas, aunque se recomienda sea diurno para optimizar el tratamiento y procesamiento de las muestras durante el resto del día.

La calidad de las muestras (organismos completos, bien relajados, bien fijados) dependerá del tiempo que se le dedique en el campo, y esto facilitará su posterior identificación. Se espera que todos los organismos sean tratados de la misma forma y cuidado, y no solo los que son de interés particular para un determinado taxónomo. Con esto se busca efficientar al máximo el trabajo de recolección de muestras.

Figura 1. Muestreo en andadores flotantes de marinas turísticas. Fotos: A-B) María Ana Tovar-Hernández.



4.1.1 SELECCIÓN DE MUELLES Y REGISTRO DE INFORMACIÓN (HOJA DE CAMPO)

El procedimiento estandarizado es el siguiente:

1. Selección del andador (plataforma o muelle flotante): se recomienda considerar 1) un gradiente de recambio de agua desde la porción más externa de la marina hasta la más interna (andador externo, andador intermedio o central y andador interno), 2) seleccionar la misma cara del andador porque la insolación puede modificar la composición de especies; así, será el lado derecho o izquierdo tomando como referencia la ubicación de una persona en la entrada del andador, con dirección a la punta o extremo final del andador (en algunas ocasiones la decisión dependerá de si hay yates atracados o no), pero debe ser uniforme en cada andador y en cada muestreo.
2. Llenado de la hoja de campo (**Anexo 2**). Notar que se deben poner códigos para el responsable del llenado de la hoja de campo y para los recolectores según lo indicado en el **Anexo 3**.
3. Determinación de los parámetros fisicoquímicos del agua (salinidad, temperatura y pH) con una sonda multiparámetro marca Hanna HI 9828 o similar, o en su defecto con instrumentos individuales (salinómetro, termómetro y potenciómetro o pH-metro). Estos parámetros deberán registrarse para cada uno de los muelles que serán muestreados.

4.1.2 TOMA DE MUESTRAS PARA METABARCODING EN MARINAS TURÍSTICAS

En cada marina la primera muestra a recolectar será la destinada al estudio del metabarcoding. El tamaño de la muestra será determinado por volumen de muestra (no área): 0.5 l de

muestra. En el primer muelle, el procedimiento será el siguiente:

1. Toma de muestra: Los materiales de muestreo (red y espátula) deben ser previamente lavados y desinfectados con una solución de hipoclorito de sodio al 10%, sumergiéndolos por 3 minutos en la solución.
2. Se hará un raspado en los primeros 50 cm del andador que se encuentra debajo del nivel del agua (es un raspado pequeño, en un área aproximada de 20 x 20 cm). No es necesario que dos hombres entren al agua, pues para la toma de esta muestra basta que los recolectores estén acostados boca abajo sobre el andador. Mientras uno raspa la superficie, el otro detiene la red para evitar la pérdida de material.
3. En superficie, la persona encargada de recibir la muestra deberá usar guantes de nitrilo para vaciar parcialmente el contenido de la muestra en un frasco nuevo de vidrio de 1 l de capacidad, hasta que la muestra ocupe la mitad de la capacidad del frasco (0.5 l). El resto de la muestra (excedente) se regresará al mar.
4. La muestra será fijada inmediatamente con un buffer de dimetilsulfóxido (DMSO), que permite criopreservar las muestras. La muestra no debe ocupar más del 50% del frasco, el resto debe de ser cubierto con el fijador.
5. La muestra debe ser etiquetada *in situ* (ver detalles en los **anexos 1 y 4**).
6. Una vez fijada la muestra, esta se debe almacenar inmediatamente en una nevera con hielo para su transportación, o en su defecto en un refrigerador (4°C) o congelador durante el tiempo que dure el muestreo por sitio o localidad (entre 6 y 96 horas).

Durante el traslado del punto de muestreo a la institución de cada investigador, las muestras se deben mantener en neveras con hielo. Una vez que las muestras arriban a la institución, estas deberán mantenerse en el congelador hasta el día de su envío al laboratorio de ECOSUR-Chetumal, donde se realizará el análisis genético.

7. La muestra deberá enviarse a ECOSUR-Chetumal a más tardar una semana después del muestreo (ver punto 6.1 y **Anexo 7** para detalles del envío).

Tiempo estimado de llenado de hoja de campo y toma de una muestra

20 minutos, con tres participantes: dos para la toma de muestra y uno para toma de datos y registro de hoja de campo.

Criterios de aceptación de muestras

- ✓ Para la muestra de metabarcoding solo se deberá utilizar el frasco esterilizado.
- ✓ Dado que el método del metabarcoding es muy sensible, la persona que sea la encargada de fijar la muestra deberá de usar guantes de nitrilo.
- ✓ La muestra deberá permanecer en refrigeración-congelación.
- ✓ La muestra deberá enviarse a ECOSUR-Chetumal durante el periodo establecido (una semana después del muestreo) (ver punto 6.1 para indicaciones).

4.1.3 TOMA DE RÉPLICAS (TRES POR MUELLE)

En cada marina se estudiarán tres muelles, cada uno con tres réplicas. El primer muelle será el mismo que para el metabarcoding, por lo que las coordenadas geográficas y la determinación de los parámetros ambientales serán los mismos ya registrados en la hoja de

campo del metabarcoding. Sin embargo, estos deberán tomarse de nuevo para los dos muelles restantes. El procedimiento es el siguiente:

1. Muestreo: El marco cuadrado de PVC deberá colocarse en los primeros 50 cm debajo del nivel del agua, y posteriormente delimitar con la espátula el área a raspar. Toda la biota esclerobionte contenida en la superficie delimitada se colocará en la red de malla, evitando la pérdida de muestra. Para ello se recomienda que dos personas entren al agua, mientras una raspa la superficie marcada, la otra detiene la red para evitar la pérdida de material. Las réplicas deben hacerse en el mismo andador y en el mismo lado, a una distancia de por lo menos 3 metros una de otra. Si el muelle es somero (con una profundidad menor a 25 cm para colocar el marco cuadrado), se debe raspar la superficie contigua necesaria para cumplir con el área establecida: 0.25 m².
2. Ya en superficie, la muestra se debe vaciar en una bolsa de manta que debe tener una etiqueta según la réplica que le corresponda (R1: réplica 1, R2 o R3). La bolsa debe anudarse y colocarse en una cubeta. El contenido se cubre con agua marina y se deberá colocar una bomba de aire portátil por cubeta. Esto último con el objetivo de mantener con vida los organismos hasta su procesamiento. A parte de la bomba, se recomienda hacer recambio de agua de cada cubeta.
3. Traslado de muestras a hotel, palapa, toldo o laboratorio.
4. El proceso antes descrito se hará cuantas veces sea necesario en cada muelle. Por ejemplo, si en la marina La Paz se eligieron tres sitios de muestreo (andador

externo, andador intermedio, andador interno). Primero se tomarán las tres réplicas del andador externo y se llevarán al lugar donde serán procesadas según lo indicado en el punto 4 de este documento (tratamiento de muestras *in situ*). Hasta terminar las actividades descritas en el punto 4, se regresará al andador intermedio para tomar las coordenadas geográficas, los parámetros ambientales y recolectar sus tres réplicas, y así sucesivamente. Esto impedirá que 1) las muestras por separar se acumulen, 2) que los organismos comiencen a descomponerse (esponjas comunes en el fouling liberan metabolitos tóxicos y comienzan su degradación al poco tiempo de su recolección), 3) reducir el número de cubetas necesarias y minimizar su transporte.

Tiempo estimado de toma de una réplica y llenado de hoja de campo

25 minutos, con tres participantes: dos en el agua, uno en superficie.

Número de réplicas

Tres por andador. Tres andadores, 9 réplicas en total.

Criterios de aceptación de muestras

- ✓ Las muestras se consideran aceptables cuando al raspar la superficie no hay pérdida de material; es decir, todo lo raspado cae en la bolsa de malla.
- ✓ En marinas turísticas es raro que ocurra pérdida de muestra, pues es una zona protegida en la que no hay oleaje, pero si por alguna razón hubiera pérdida de material, la muestra debe tomarse de nuevo en otra área del mismo andador.

Aseguramiento de calidad y control en el muestreo

El objetivo del aseguramiento y control de calidad en el muestreo es minimizar los errores en el tratamiento de las muestras de esclerobiontes y asegurar la significancia y validez de los resultados obtenidos durante todo el proceso del tratamiento de muestras. Para aumentar la probabilidad de éxito en la recolección de las muestras, cada muestra individual junto con sus réplicas deberá de ser recolectada por las mismas personas (como se dijo antes, se requieren dos personas en el agua).



Lista de materiales y reactivos

1. Bastidor con bolsa recolectora.
2. Espátula y/o formón.
3. Marco cuadrado de PVC 25 x 25cm.
4. Equipo de buceo básico.
5. Guantes de neopreno.
6. Guantes de nitrilo.
7. Frascos de vidrio 1 l (uno por marina) esterilizados.
8. Hipoclorito de sodio al 10%.
9. Cubeta para desinfección de red, formón y/o espátula.
10. Tres cubetas para colocar temporalmente muestras: una para cada réplica.
11. Buffer DMSO.
12. Etiquetas de papel resistal (**Anexo 4**).
13. Marcador indeleble y lápiz, o plumón a prueba de agua y alcohol (water and fade proof).
14. Parafilm.
15. Nevera.
16. Hielo y/o geles refrigerantes.
17. Sonda multiparamétrica (o salinómetro, termómetro, potenciómetro o pH-metro).
18. GPS.
19. Bolsas de manta con jareta.
20. Bitácora de campo.
21. Hojas de campo.
22. Bombas portátiles con manguera y difusores.



Figura 2. Materiales de muestreo y frascos. A) Bastidor con bolsa recolectora, B) bastidor y marco cuadrado, C) sonda multiparamétrica. D) pipetas plásticas, E) pinzas de campo, F) bolsas recolectoras de muestras, G) espátula y formón, H-J) frascos y viales para el almacenamiento de muestras. **Fotos:** A-I) María Ana Tovar-Hernández, J) Angel de León-González.

4.1.4 TRATAMIENTO DE LAS MUESTRAS *IN SITU*

Una vez que las muestras arriben a un lugar de trabajo (sea hotel, palapa, toldo o laboratorio), se hará un recambio del agua de mar de cada cubeta y se deberán mantener con aireación mientras se procesa el material.

4.1.5 SEPARACIÓN PRELIMINAR A GRANDES GRUPOS ANIMALES

El material recolectado se separará en primer lugar en grandes grupos (**Figura 3**) de acuerdo con la siguiente clasificación:

- | | | |
|--------------|------------|--------------|
| ✓ Tunicados | ✓ Esponjas | ✓ Poliquetos |
| ✓ Crustáceos | ✓ Moluscos | ✓ Otros |

Otros: incluye todos los demás grupos (briozoos, camptozoos, nemertinos, hidrozooos, sipúnculos, etc).

El procedimiento es el siguiente:

Separación

1. En una mesa deben colocarse seis recipientes de plástico con agua de mar (uno para cada grupo taxonómico).
2. En un recipiente grande (30 cm de lado x 5 cm de alto) se vaciará todo el contenido de 1 muestra.
3. Se comenzará la separación a grandes grupos taxonómicos con el uso de pinzas y pipetas de plástico y silicona (recomendadas para evitar la fragmentación o herida de los ejemplares), colocándolos en su respectivo recipiente, hasta terminar de separar la muestra.
4. El agua que queda en el contenedor grande debe tamizarse con un colador de 500 μm de apertura de malla, o con la misma red en la que se recolectaron para recuperar los organismos más pequeños, e incorporarlos al contenedor que correspondan.

Envasado

5. Los grupos taxonómicos separados (excepto poliquetos, ya que se procesarán a detalle después), se guardarán en frascos de vidrio de diferente capacidad optimizando el espacio y el contenido (ver en materiales de envasado). La muestra no debe ocupar más del 50% de la capacidad del frasco.

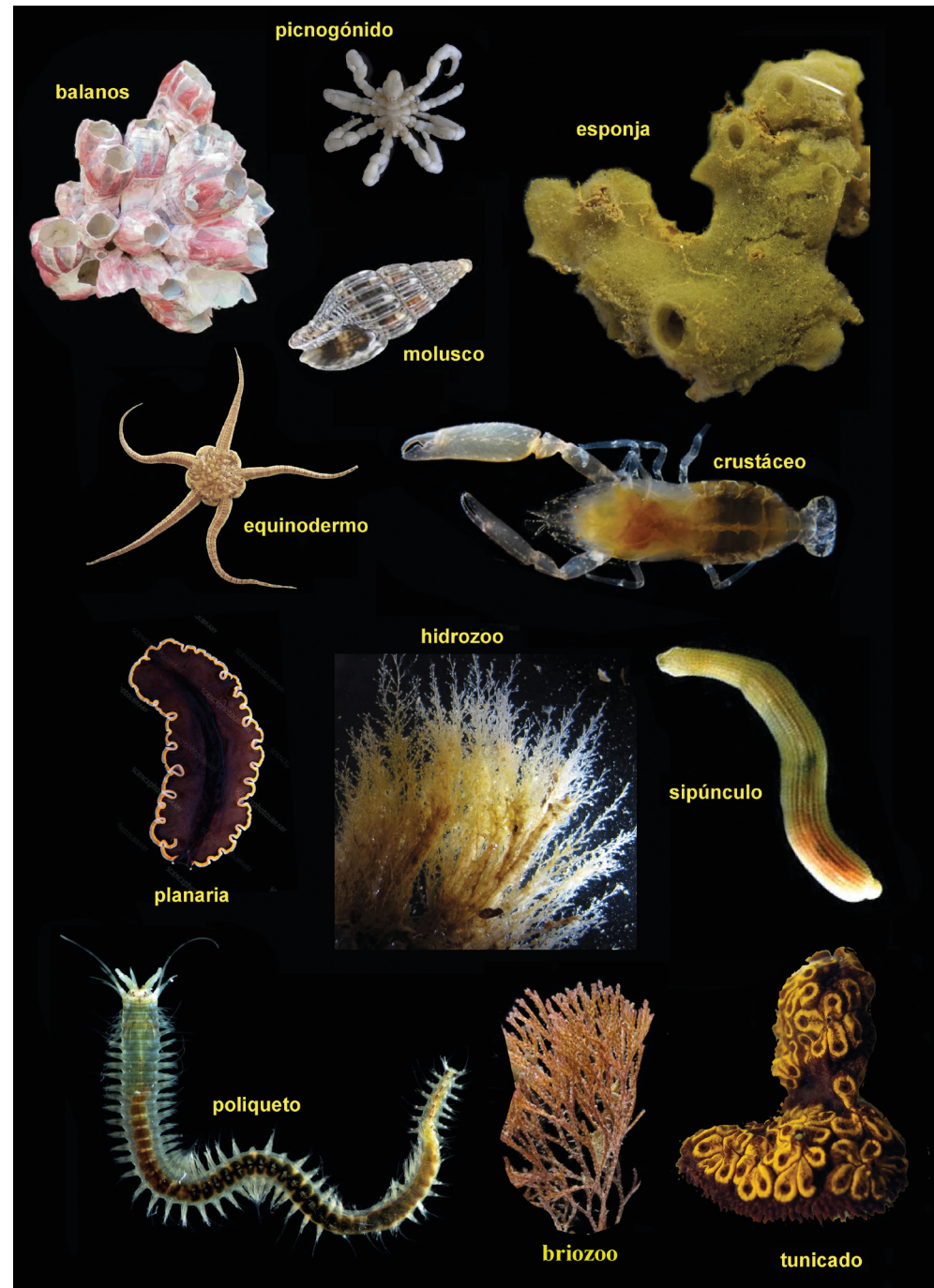


Figura 3. Invertebrados marinos comunes en la biota portuaria. Fotos: Humberto Bahena-Basave.

Etiquetado

- Las muestras se etiquetarán (doble etiquetado) según lo indicado en el **Anexo 4**, utilizando el identificador único para cada muestra (**Anexo 1**).

Fijación

- Todas las muestras (a excepción de la del metabarcoding que ya se explicó en el punto 4.1.2) se fijarán en etanol 95° sin desnaturalizar. El fijador debe cubrir el 90% de la capacidad del frasco ya con la muestra incluida. Salvo algunas pocas excepciones, y cuando los organismos así lo requieran (ostiones u otro animal grande) se fijarán en formol al 4%, indicándolo claramente en la etiqueta y en la hoja de campo. Los frascos una vez cerrados, deben ser sellados con parafilm u otro plástico para evitar la pérdida de líquido.

Refrigeración o congelación

- Las muestras fijadas en etanol deberán colocarse en neveras cambiando constantemente el hielo, o en refrigeración a 4°C, o en congelación durante todo el tiempo (horas o días) que dura el trabajo de campo, pues esto optimiza la obtención del material genético.

TIEMPO ESTIMADO PARA LA SEPARACIÓN PRELIMINAR
Media hora por réplica o por muestra selectiva.

CRITERIOS DE ACEPTACIÓN DE MUESTRAS

- ✓ La muestra debe ocupar el 50% de la capacidad del frasco.
- ✓ La muestra debe alcanzar el 90% de la capacidad total con el fijador.
- ✓ La muestra deberá contar con su respectiva etiqueta (interna y externa).
- ✓ La muestra debe estar en un frasco de vidrio.

Lista de materiales y reactivos

- Frascos de vidrio con tapa de rosca de diferente capacidad (45, 125, 250, 500 ml, 1 l).
- Recipientes de plástico transparente o blanco de varios tamaños y formas (círculo, cuadro, rectángulo) con por lo menos 3 cm de altura.
- Pinzas.
- Pipetas plásticas o silicona.
- Colador de plástico con 500 µm de luz de malla.
- Etiquetas de papel resistall (Anexo 4).
- Lápices y sacapuntas, o plumines a prueba de agua y alcohol (water and fade proof).
- Etanol 95° sin desnaturalizar.
- Formol al 4% preparado con agua de mar.
- Pisetas (una para etanol, otra para formol; ambas claramente etiquetadas).
- Embudo.
- Parafilm para sellar bocas de frascos.
- Jabas o cubetas con tapa.
- Neveras, hielo o geles refrigerantes.

4.1.6 POLIQUETOS, SEPARACIÓN PRELIMINAR A NIVEL FAMILIA

Los poliquetos serán separados en vivo a nivel de familia en la medida de lo posible (Figura 4). El procedimiento es el siguiente:

SEPARACIÓN

- Se prepararán contenedores de plástico con agua de mar, uno para cada familia que pueda identificarse a simple vista de acuerdo con la experiencia del equipo de trabajo, uno para poliquetos sin reconocer familia a simple vista, y otro para ejemplares que serán fotografiados en vivo (ver punto 4.1.7).
- Con ayuda de pipetas de plástico y silicona (recomendadas para evitar la fragmentación o herida de los ejemplares) y pinzas (menos recomendadas) se van separando los ejemplares en familias y colocando en su respectivo contenedor. En esta etapa deben seleccionarse los

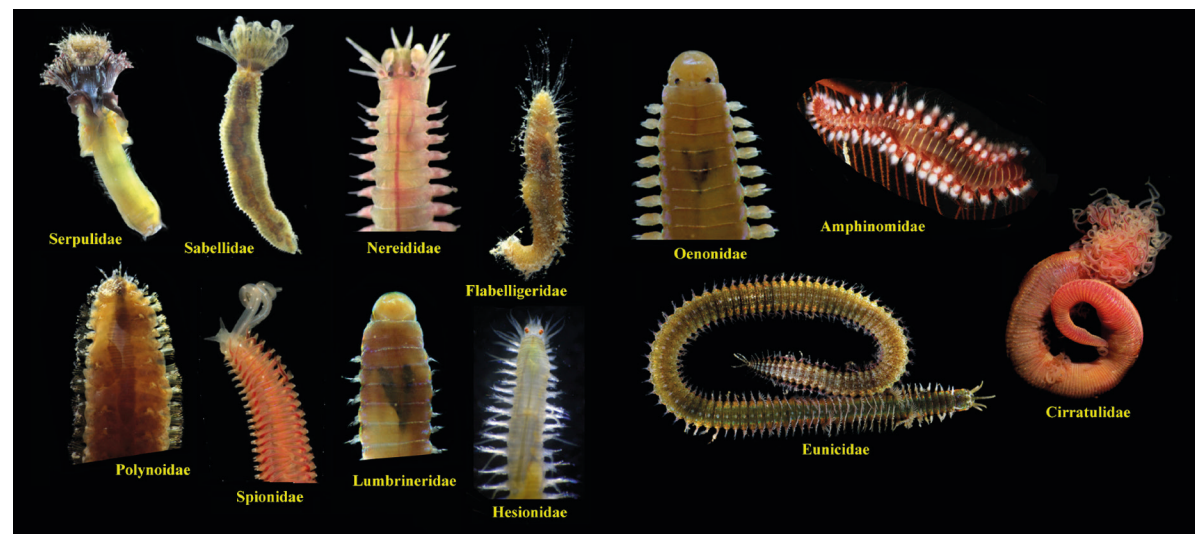


Figura 4. Representantes de las familias de poliquetos de interés. **Fotos:** Humberto Bahena-Basave.

ejemplares que serán fotografiados en vivo y darlos al responsable de fotografía para proceder con su tratamiento (ver punto 4.1.7).

ENVASADO

- Una vez terminada la separación, cada familia deberá verterse en el frasco donde se relajará, fijará y transportará la muestra. La muestra no deberá cubrir más de la mitad del frasco y se le podrá un poco de agua de mar limpia, solo lo suficiente para cubrir los gusanos únicamente.

ETIQUETADO

- A cada frasco de poliquetos se le pondrá tres etiquetas (una interna, una externa, una roja en la tapa) siguiendo el código de cuatro letras para familias de poliquetos (**Anexo 5**). Los poliquetos que queden sin identificación preliminar a nivel familia se colocarán en un frasco (etiquetado como POLY). La etiqueta de la tapa consiste en una etiqueta roja circular de 2 cm de diámetro; en su defecto, se recomienda una marca con un trozo de cinta gris o canela en la tapa.

RELAJACIÓN

- La relajación se realizará por shock térmico para todas las familias de poliquetos. Esta consiste en poner los frascos de vidrio con los poliquetos en una nevera con hielo o refrigerador (4°C) entre 10 y 15 minutos, para después proceder a su fijación. Algunas recomendaciones específicas para determinadas familias son las siguientes:

Polynoidae (POLN): son muy delicados pues al menor estímulo con cualquier sustancia desprenden las escamas

(élitros) o se fragmentan. Se recomienda que el choque térmico sea de 30 minutos (si se dejan más de 1 hora se ablandan, no agregar hielo al frasco o a la caja Petri, pues ocasiona su fragmentación).

Sabellidae (SABE): se recomienda remover el tubo de por lo menos 3 ejemplares por especie antes de relajarlos y fijarlos, pues si los organismos quedan dentro del tubo no quedan bien fijados porque los cuerpos quedan fuertemente adheridos al tubo. Para remover el tubo de los ejemplares vivos, se desliza una pinza de la parte más posterior del tubo hacía la más anterior. Una vez afuera el sabélido, se puede relajar con choque térmico igual que el resto de los poliquetos.

Serpulidae (SERP): a diferencia de Sabellidae, conservar el tubo de los serpúlidos es importante, pues es de relevancia taxonómica. Sin embargo, se recomienda fragmentar el tubo con la finalidad de que el fijador entre al tubo y haga su función en el organismo.

Spionidae (SPIO): si estos ejemplares proceden de ostiones, se recomienda que una muestra representativa de ellos (3 ejemplares) sean retirados de la concha del ostión para permitir que queden bien fijados.

Sabellariidae (SABI): se recomienda fragmentar el tubo con la finalidad de que el fijador entre al tubo y haga su función en el organismo.

FIJACIÓN

- Una vez transcurrido el tiempo de relajación, se debe retirar el agua de mar de cada frasco con ayuda de una coladera de 500 µm de luz de malla que impida la pérdida de muestra.

- Todas las muestras (a excepción de la del metabarcoding que ya se explicó en el punto 4.1.2) se fijarán en etanol 95° sin desnaturalizar. El fijador debe cubrir el 90% de la capacidad del frasco ya con la muestra incluida. Salvo algunas pocas excepciones, y cuando los organismos así lo requieran (gusanos de fuego, u otro animal grande) se fijarán en formol al 4%, indicándolo claramente en la etiqueta y en la hoja de campo. Los frascos una vez cerrados, deben ser sellados con parafilum para evitar la pérdida de líquido.

REFRIGERACIÓN O CONGELACIÓN

- Las muestras fijadas en etanol deberán colocarse en neveras cambiando constantemente el hielo, o en refrigeración a 4°C, o en congelación durante todo el tiempo (horas o días) que dura el trabajo de campo, pues esto optimiza la obtención del material genético.

Lista de materiales

Además de los mismos descritos en el punto 4.1.5:

- Viales de plástico Eppendorf con tapa de rosca de diferente capacidad (2, 5, 15 y 45 ml).
- Etiquetas circulares rojas.

Tiempo estimado separación preliminar

Media hora por réplica o por muestra selectiva.

Criterios de aceptación de muestras

Los mismos descritos en el punto 4.1.5.

4.1.7 FOTOGRAFÍA EN VIVO

Se seleccionarán algunos de los poliquetos provenientes de los muestreos a criterio de cada investigador para ser fotografiados en vivo. Tendrán preferencia las familias

comprometidas en el proyecto: Amphinomidae, Cirratulidae, Eunicidae, Flabelligeridae, Hesionidae, Lumbrineridae, Nereididae, Oeonidae, Polynoidae, Sabellidae, Serpulidae y Spionidae, y en segundo término cualquier representante de otra familia. Algunos criterios a tener en cuenta en la selección de especies para fotografía son:

- a. Que sea la especie más abundante por localidad.
- b. Que sea una especie con un patrón de coloración distintivo, o variable de acuerdo al tipo de sustrato.
- c. Que sea la especie menos abundante en el muestreo.

Procedimiento:

1. Llenar el registro fotográfico con los datos del ejemplar a fotografiar.
2. Colocar el gusano a fotografiar en la caja de Petri con agua marina limpia (preferentemente filtrada, que no lleve sedimentos ni restos de otros animales o materia orgánica).
3. Limpiar los gusanos con pinceles de pelo de camello de diferente grosor (#1, 3 o 5) antes de tomar las imágenes.
4. Colocar un fondo negro en la base de la caja de Petri.
5. Capturar las fotografías al criterio del investigador, pero considerar por lo menos una de cuerpo entero en vista dorsal.
6. El ejemplar fotografiado debe guardarse por separado en un vial Eppendorf con su respectiva etiqueta y en el anverso de la etiqueta indicar el número de foto (número consecutivo de foto por grupo de trabajo: 01, 02, 03, 04) y el identificador del fotógrafo (usando los códigos para recolectores, taxónomos y fotógrafos del **Anexo 3**).

7. La muestra debe fijarse con etanol 96°.
8. El vial deberá colocarse en una bolsa ziploc con el resto de ejemplares fotografiados, y depositarse en la nevera.
9. En la hoja de campo debe indicarse si se tomaron fotografías e indicar el rango de números respectivos de fotos (Ej. fotos 01-19).

Criterios de aceptación de fotografías

Las fotografías deberán tomarse en alta resolución, use el siguiente cuadro como guía:

Calidad de imagen al programar la cámara	L (no usar S, o M)
Píxeles grabados	11-24M dependiendo de la cámara
Tamaño del archivo	4-7.6 MB

Lista de materiales

1. Microscopio de campo con servicio de mantenimiento reciente.
2. Cámara fotográfica con adaptadores al microscopio, mínimo de 11 Megapíxeles.
3. Lámpara LED.
4. Extensión eléctrica.
5. Regulador de voltaje.
6. Cajas de Petri de plástico o vidrio para uso exclusivo para fotografía (no estar rayadas).
7. Un fondo negro de plástico de 5 cm x 5 cm (pueden servir las carátulas usadas para engargolar).
8. Pinzas.
9. Pinceles de pelo de camello de diferente grosor (#1, 3 o 5).
10. Pipetas plásticas de laboratorio 2 ml.
11. Pipetas de cocina (de silicona o plástico, de 28 cm largo, con una perilla de 5 cm de diámetro y 30 ml capacidad).
12. Piseta con etanol 96° sin desnaturalizar.
13. Viales de plástico Eppendorf de varios tamaños.

Lista de materiales

14. Bolsa ziploc exclusiva para ejemplares fotografiados por localidad.
15. Etiquetas de papel resistall (**Anexo 4**).
16. Lápices y sacapuntas, o plumines a prueba de agua y alcohol (water and fade proof).
17. Etanol 95° sin desnaturalizar.
18. Parafilm para sellar bocas de viales.

4.2 PUERTOS DE ALTURA Y CABOTAJE

Estos muestreos se harán en las boyas de señalización marítima del canal de navegación principal de cada puerto de altura o cabotaje (Figura 5). Se recomienda muestrear en tres boyas diferentes: una externa (ubicada en la entrada al puerto), una intermedia y una interna (cercana a cualquier terminal: ferry, Secretaria de Marina (SEMAR), automotriz, petrolera, granelera, turística, de carga, etc.).

BIOTA PORTUARIA MEXICO	
ID <u>HUX-A-Q-20210826-6</u>	
TAXON	<u>SERP</u>
OH <input checked="" type="checkbox"/> Formol	Col. <u>JRB2</u>

Figura 5. Ejemplo de correcto llenado de etiqueta

Para este muestreo, es importante la participación y logística de la Administración del Sistema Portuario Nacional (ASIPONA) de cada puerto. El traslado se hace en una embarcación con motor fuera de borda preferentemente de la ASIPONA, pero también se puede rentar. El capitán, en comunicación con la Capitanía de Puerto, dictan el momento en que dos participantes entren al agua a realizar el muestreo en cada boya. Para ello, los responsables del muestreo en cada localidad, deberán contactar con 2 o 3 semanas de antelación al Director General de la ASIPONA correspondiente vía E-mail solicitando autorización y apoyo. Se recomienda verificar la entrega y recepción de la solicitud al director de la ASIPONA, llamando vía telefónica a su asistente personal, y darle seguimiento diario hasta obtener certeza del apoyo, día, hora y equipo que será facilitado.

Al igual que en los andadores de las marinas turísticas, las boyas de señalización en puertos de altura y cabotaje son estructuras flotantes, por lo que siempre se encuentran al mismo nivel. El procedimiento es el siguiente:

1. Registro de las geocoordenadas geográficas.
2. Registro de los parámetros fisicoquímicos.
3. Muestreo (igual al descrito en el muestreo cuantitativo para marinas), a excepción de que las tres boyas y sus respectivas réplicas se tomarán en un solo viaje (sin procesar una por una), pues se requiere el uso de embarcación y el trabajo está sujeto a las facilidades de cada ASIPONA.
4. Traslado de muestras a hotel, palapa, toldo o laboratorio.



Figura 5. Boyas de señalamiento marítimo en puertos de altura y cabotaje.
Fotos: A-C) Victoria Diaz-Castañeda, D) Humberto Bahena-Basave.

TIEMPO ESTIMADO DE TOMA DE UNA RÉPLICA Y LLENADO DE HOJA DE CAMPO

Variable. Depende de 1) la distancia entre cada boya, 2) tipo de embarcación, 3) emisión de autorizaciones de la capitanía de puerto según el tráfico marítimo. Sin embargo, se recomienda que el tiempo total del muestreo no sea mayor a tres horas para garantizar el correcto tratamiento de las muestras.

NÚMERO DE RÉPLICAS

Tres por boya. Tres boyas, 9 réplicas en total.

CRITERIOS DE ACEPTACIÓN DE MUESTRAS

Descrito en el punto 4.1.3.

ASEGURAMIENTO DE CALIDAD Y CONTROL EN EL MUESTREO

Descrito en el punto 4.1.3.

LISTA DE MATERIALES

Descrito en el punto 4.1.3

4.2.1. TRATAMIENTO DE LAS MUESTRAS *IN SITU*

Descrito en el punto 4.1.4.

4.2.2. SEPARACIÓN PRELIMINAR A GRANDES GRUPOS TAXONÓMICOS

Descrito en el punto 4.1.5

4.2.3. POLIQUETOS: SEPARACIÓN PRELIMINAR A NIVEL FAMILIA

Descrito en el punto 4.1.6

4.2.4. FOTOGRAFÍA EN VIVO

Descrito en el punto 4.1.7.

5. MUESTREOS SELECTIVOS

5.1 MARINAS TURÍSTICAS Y PUERTOS

Se harán estos muestreos en distintos sustratos artificiales sumergidos en busca de los grupos taxonómicos de interés. En las marinas turísticas y

puertos de altura y cabotaje se revisarán sustratos disponibles como boyas, pilotes, muelles, cascos de embarcaciones, rocas de escolleras, cimientos, cabos, redes y trampas sumergidas y otras estructuras flotantes inusuales (basura flotante como maderas, plásticos, uncel y otros objetos a la deriva) (Figura 6). Las muestras seleccionadas deberán elegirse ya sea por pertenecer a un grupo taxonómico de interés, por su rareza, tamaño, color, cobertura, asociación con otro animal, etc.).

El procedimiento es el siguiente

1. Selección de sustratos.
2. Llenado de la hoja de campo (**Anexo 2**).
3. Registro de las geocoordenadas geográficas.
4. Determinación de los parámetros fisicoquímicos del agua.
5. Muestreo libre. Cada muestra se pondrá en una bolsa de manta o de plástico, o en botes de plástico.
6. Traslado de muestra a una instalación (hotel, palapa, toldo o laboratorio).



Figura 6. Sustratos artificiales de origen antropogénico. A) Cascos de embarcaciones, B) llanta semi-hundida, C) boya, D) cabo sumergido, E) llanta sumergida. C-E) se extrajeron del agua para la fotografía.

Fotos: A-B) Victoria Díaz-Castañeda, C-E) María Ana Tovar-Hernández.

Tiempo estimado de toma de una muestra selectiva y llenado de hoja de campo

Una hora.

Número de muestras selectivas

Marinas turísticas: 2 muestras.

Puertos: 2 muestras.

Criterios de aceptación de muestras

- ✓ Las muestras se consideran aceptables cuando la muestra cuenta con su etiqueta y la hoja de campo fue llenada correctamente.

Lista de materiales

Bolsas ziploc de diferente capacidad (snack: 16.5 cm x 8.2 cm; sándwich: 16.5 cm x 14.9 cm; congelar mediana: 17.7 x 19.5 cm, congelar grande: 26.8 cm x 27.3 cm).

Bolsas de malla o manta de 40 x 40 cm.

Espátula y formón.

Viales de plástico con tapa de rosca de diferente capacidad: 2 ml, 15 ml, 50 ml.

Cubeta para colocar las muestras y permitir un traslado seguro a la instalación.

Etiquetas.

5.1.2 TRATAMIENTO DE LAS MUESTRAS *IN SITU*

Descrito en el punto 4.1.4.

5.1.3 SEPARACIÓN PRELIMINAR A GRANDES GRUPOS TAXONÓMICOS

Descrito en el punto 4.1.5.

5.1.4 POLIQUETOS: SEPARACIÓN PRELIMINAR A NIVEL FAMILIA

Descrito en el punto 4.1.6

5.1.5 FOTOGRAFÍA EN VIVO

Descrito en el punto 4.1.7.

5.2 ÁREAS NATURALES PROTEGIDAS (ANPs)

En las áreas naturales protegidas, los muestreos tienen la intención de detectar especies introducidas. Los muestreos serán selectivos, y pueden ser tanto en sustratos naturales (rocas, coral muerto, raíces de mangle, etc.) como en aquellos de origen antropogénico (muelles de madera, cascos de las lanchas, cabos sumergidos, en "muertos", boyas de botellas de plástico, basura flotante).

Procedimiento

Descrito para el punto 5.1.

Tiempo estimado de toma de una muestra selectiva y llenado de hoja de campo

Una hora.

Número de muestras selectivas

Dos por ANP.

Criterios de aceptación de muestras

- ✓ Las muestras se consideran aceptables cuando la muestra cuenta con su etiqueta y la hoja de campo fue llenada correctamente.

Lista de materiales

Mismos descritos en el punto 5.1

5.2.1 TRATAMIENTO DE LAS MUESTRAS *IN SITU*

Igual al descrito en el punto 4.1.4.

5.2.2. SEPARACIÓN PRELIMINAR A GRANDES GRUPOS TAXONÓMICOS

Igual al descrito en el punto 4.1.5.

5.2.3 POLIQUETOS: SEPARACIÓN PRELIMINAR A NIVEL FAMILIA

Igual al descrito en el punto 4.1.6.

5.2.4. FOTOGRAFÍA EN VIVO

Igual al descrito en el punto 4.1.7.

6. TRASLADO MUESTRAS A INSTITUCIONES DE ORIGEN

- ✓ Las muestras de metabarcoding deben transportarse hacia el laboratorio institucional en refrigeración (en hieleras con hielo o geles refrigerantes).
- ✓ Las muestras fijadas en etanol deberán transportarse en neveras con hielo o geles refrigerantes, o en jabas o en cubetas con tapa para su traslado a la institución de cada investigador participante.
- ✓ Al llegar al laboratorio, el responsable del trabajo de campo deberá entregar la cadena de custodia de invertebrados bentónicos al responsable de laboratorio debidamente llenada (**Anexo 6**), quien deberá revisar los lotes que le son entregados, y el estado en el que llegan las muestras.

6.1 ENVIÓ MUESTRAS METABARCODING A ECOSUR-CHETUMAL

Una semana después de terminado el muestreo, el responsable de cada institución participante deberá enviar las muestras de metabarcoding a ECOSUR-Chetumal junto con la cadena de custodia (**Anexo 7**) referente al muestreo de metabarcoding.

7. TRATAMIENTO DE MUESTRAS EN LABORATORIO

7.1 LAVADO Y REVISIÓN DE ETIQUETAS

Este proceso deberá hacerse una semana después de regresar al laboratorio (no antes), esto permitirá la correcta fijación de las muestras.

Lavado y recambio de etanol

Las muestras que fueron fijadas en formol deberán de lavarse con agua corriente y posteriormente preservadas con etanol al 70%. Las muestras que fueron fijadas con etanol, no se les reemplazará el etanol en este momento, sino hasta cuando se haga la separación a grandes grupos para optimizar el uso de alcohol.

Revisión de etiquetas

Se revisarán las etiquetas y se reemplazarán las que así lo requieran, tanto internas (viales) como externas (frascos de almacenamiento).

Tiempo estimado

Este proceso deberá realizarse en un día.

7.2 SEPARACIÓN DEFINITIVA A GRANDES GRUPOS TAXONÓMICOS

Algunos poliquetos suelen esconderse entre las conchas de moluscos y balanos, enredarse en las patas de los decápodos o entre briozoos, encontrarse en los tejidos de esponjas o entre los tapetes de ascidias, o cualquier otro recoveco. Por ello, las muestras procedentes de los muestreos cuantitativos y separadas a grandes grupos serán revisadas en el laboratorio con la finalidad de extraer los poliquetos que saldrán a la vista después de la fijación. El procedimiento consiste en:

- ✓ Verter el contenido de cada lote en un recipiente de plástico transparente o blanco, o refractario (se revisará toda la muestra).
- ✓ Poco a poco se debe ir transfiriendo pequeñas cantidades de muestra en una caja de Petri para su separación con lupa o estereomicroscopio.

- ✓ Los poliquetos recuperados serán almacenados y etiquetados de acuerdo con la información de las etiquetas de colecta.

CURACIÓN DE LOS GRANDES GRUPOS

A las muestras se les debe poner alcohol nuevo. Los frascos se sellarán con parafilm.

Tiempo estimado

1 semana.

Cadena de custodia

- ✓ Deberá llenarse el formato de cadena de custodia para la curación y separación de muestras a grandes grupos (**Anexo 8**).

Destino de las muestras

Las muestras ya curadas se resguardarán en las colecciones institucionales de cada uno de los participantes. Las muestras y su información asociada deberán de estar disponible para el grupo de trabajo, para garantizar su mantenimiento y conservación. El Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada (CICESE), el Instituto Tecnológico de Bahía Banderas (ITBB) y la Universidad de Guadalajara (UDG) enviarán las muestras a la Universidad Autónoma de Nuevo León (UANL).

Colecciones de referencia

Colección Poliquetológica de la Universidad Autónoma de Nuevo León (NL-INV-0002-05-09)

Colección de Invertebrados Marinos de la Universidad del Mar (OAX-CC-249-11)

Colección de Bentos Costero de El Colegio de la Frontera Sur (QNR. IN.021.0497)

7.3 SEPARACIÓN DEFINITIVA DE FAMILIAS DE POLIQUETOS

En laboratorio, se hará la separación definitiva a nivel de familia. Se separarán todas las familias que salgan en cada muestreo. El taxónomo de cada institución deberá llenar la hoja 2 de la Base de datos de Excel "Biota portuaria" referente a las familias de poliquetos presentes por estación: ausencia-presencia.

Tiempo estimado

1 mes.

Aseguramiento de calidad y control en el laboratorio

Para aumentar la probabilidad de éxito en el tratamiento de muestras, cada muestra individual junto con sus réplicas deberá de ser asignada y tratada por una misma persona. Si un estudiante, técnico o asistente identifica las muestras, se espera que los taxónomos de poliquetos validen la identificación de las familias. Las identificaciones de ECOSUR-Campeche serán corroboradas por ECOSUR-Chetumal, mientras que las de la UDG, por la UANL.

Cadena de custodia

Deberá llenarse el formato de cadena de custodia para la curación y separación de muestras a nivel de familia (**Anexo 9**).

7.4 ENVÍO DE FAMILIAS A SU RESPECTIVO TAXÓNOMO

Cada familia comprometida en el proyecto será enviada a su respectivo taxónomo usando el formato del **Anexo 7**, mientras que el resto serán resguardadas en las colecciones institucionales de cada uno de los participantes.

ASEGURAMIENTO DE CALIDAD Y CONTROL EN EL LABORATORIO

El responsable del manejo de muestras e información de cada institución participante deberá armar cada uno de los paquetes con las familias de poliquetos que serán enviadas a su respectivo especialista y llenar la cadena de custodia que le corresponde (**Anexo 7**).

A Chetumal se enviarán Amphinomidae, Eunicidae, Hesionidae, Flabelligeridae, Lumbrineridae, Oeonidae y Spionidae.

Atención: *Luis Fernando Carrera-Parra y/o Sergio I. Salazar-Vallejo*

Dirección: *Laboratorio de Ecología Costera, El Colegio de la Frontera Sur, Avenida Centenario Km 5.5, Chetumal, Quintana Roo. CP. 77014.*

A Monterrey se enviarán Cirratulidae y Nereididae.

Atención: *Jesús Angel de León-González y/o María Elena García-Garza*

Dirección: *Laboratorio de Biosistemática, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Nuevo León, Av. Pedro de Alba Esquina Manuel L. Barragán, San Nicolás de los Garza, Nuevo León, CP. 66455.*

A Huatulco se enviará Serpulidae.

Atención: *Rolando Bastida-Zavala*

Dirección: *Calle Garzas s/n, manzana 12, lote 17, sector K, Bahías de Huatulco, Oaxaca, CP 70988.*

A Mazatlán se enviará Sabellidae.

Atención: *María Ana Tovar-Hernández*

Nota: *Entrega a domicilio o al servicio de ocurre (ambas opciones)*

Dirección: *Circuito Julio Berdegué Aznar 457, El Cid, Mazatlán, Sinaloa, CP. 82110.*

A Puerto Vallarta se enviará Polynoidae.

Atención: *Patricia Salazar-Silva*

Dirección: *Calle Valle de Nispero no. 252, coto 4, Frac. los Encantos, Bahía de Banderas, Nayarit, CP. 63732.*

Nota: *Si el servicio es a "ocurre" seleccionar alguna sucursal en Puerto Vallarta, Jalisco.*

Cadena de custodia

El responsable de cada institución debe llenar las cadenas de custodia (**Anexos 7 y 9**) y enviarlas junto con las muestras. A su vez, el receptor debe llenar lo que le corresponde, escanear y mandar de regreso vía correo electrónico al colega que envía las muestras.

Tiempo estimado

1 mes (preparación, envío y recepción de muestras entre instituciones).

7.5 IDENTIFICACIÓN DE POLIQUETOS A NIVEL DE ESPECIE, ABUNDANCIA Y DENSIDAD (2 MESES)

Los taxónomos responsables tendrán dos meses después del muestreo para identificar a nivel de especie la o las familias que cada uno comprometió. Se deberán identificar a especie todas las muestras. Por ningún motivo se permitirán submuestras.

El informe individual consiste en llenar la hoja 3 (Especies de Poliquetos) de la Base de Datos de Excel "Biota Portuaria" de cada institución, por lo que serían siete archivos o bases de datos según el siguiente esquema:

ECOSUR-CHETUMAL-UQROO	Cancún y Veracruz
ECOSUR-CAMPECHE	Campeche, Puerto Lerma
CICESE	Ensenada, El Sauzal, Bahía de los Angeles, San Felipe
ITBB	La Cruz de Huanacaxtle, Puerto Vallarta, Isla Marietas
UANL-A	La Paz, Santa Rosalía, Los Cabos, Isla Cerralvo, Loreto
UANL-B	Mazatlán, Topolobampo, Marismas Nacionales
UDG	Manzanillo
UMAR	Huatulco, Salina Cruz

Deberán registrar los géneros y especies en orden alfabético, con su respectivo autor y año.

- ✓ Agregar cuantas filas sean necesarias.
- ✓ Se debe registrar la abundancia de cada especie (**Importante:** solo contabilizar ejemplares completos o con la región anterior, no contabilizar fragmentos de otras partes del cuerpo, pero si hay fragmentos conservarlos en el respectivo lote).
- ✓ El responsable de cada institución deberá recopilar la información a los taxónomos de cada familia e incorporarla en la tabla final por institución.

7.6 SELECCIÓN DE ESPECIES PARA EL CÓDIGO DE BARRAS

Una vez identificados los organismos fijados en etanol al 96%, se seleccionarán aquellas especies de poliquetos que deseen sean procesados para el análisis molecular de acuerdo con alguno de los siguientes criterios de selección.

Criterios de selección de especies

- ✓ Especies de amplia distribución.
- ✓ Especies anfiamericanas.
- ✓ Especies introducidas.
- ✓ Especies descritas para el territorio mexicano como localidad tipo.

Criterios para procesar las muestras

1. Dos meses después del muestreo se deberá enviar entre 3 y 5 ejemplares de la misma especie (preferentemente de diferentes marinas turísticas o localidades) para garantizar que se obtengan secuencias de la especie (con su respectiva cadena de custodia **Anexo 7**).
2. Es requisito indispensable que dichos ejemplares cuenten con al menos un par de fotografías.
3. Enviar dos bases de datos de acuerdo con los formatos de BOLD systems, que corresponden a la información taxonómica y de colecta (Base de datos "SpecimenData_v3Transitional" (**Anexo 12**)), como la relacionada a las fotografías (Base de datos "Image data" (**Anexo 13**)). En ambas bases de datos, la primera línea contiene un ejemplo del correcto llenado de los campos.

Las especies seleccionadas para el código de barras, deberán enviarse a:

Atención: Luis Fernando Carrera-Parra y/o Areli Martínez Arce

Dirección: Laboratorio de Ecología Costera, El Colegio de la Frontera Sur, Avenida Centenario Km 5.5, Chetumal, Quintana Roo. CP. 77014.

Criterios de aceptación de muestras

- ✓ Las muestras se consideran aceptables para proceder a su extracción del ADN solo si se mandan entre 3 y 5 ejemplares de la misma especie.

- ✓ Si envían las bases de datos "SpecimenData_v3Transitional" (**Anexo 12**), "Image data" (**Anexo 13**) correctamente llenadas y por lo menos dos fotografías de cada especie.
- ✓ Entregarlas a los dos meses de terminado el muestreo. Se espera que las especies a procesar sean las que tienen detectado algún problema en su identificación, y se desea corroborar, negar, o respaldar su estado como "exóticas", "anfiamericanas", etc.

7.7 PREPARACIÓN DE TEJIDOS PARA EL CÓDIGO DE BARRAS

En ECOSUR-Chetumal los ejemplares deben ser procesados de la siguiente manera:

Espacio de trabajo

En el laboratorio se debe seleccionar una mesa de trabajo para usarla en la toma de muestra de tejido. El área debe limpiarse con alcohol al 70% antes de empezar con la toma de tejidos.

Material

Preparar una solución de hipoclorito sódico (cloro comercial) al 10% y desinfectar todo el material a utilizar: pinzas, cajas de Petri, bisturí, tijeras, etc. Se debe contar con dos vasos de precipitado, uno con hipoclorito al 10% y otro con alcohol al 70% para enjuagar los instrumentos. Primero se sumergen en hipoclorito, agitando vigorosamente, posteriormente los instrumentos son enjuagados en alcohol al 70% para eliminar el cloro y proceder a la toma del tejido.

Toma de tejido

Es necesario usar bata, guantes de nitrilo y tener cabello recogido para evitar la contaminación cruzada.

1. Se recomienda tomar tejido de los parápodos y/o pared corporal, evitando

alcanzar el intestino para evitar una posible contaminación de la muestra.

2. El tamaño del tejido enviado será de aproximadamente 7 mm³ o 1 cm³ para organismos grandes y, 2 a 5 mm³ para organismos pequeños.
3. Cada tejido será colocado en un tubo de centrifuga de 2 ml debidamente etiquetado, asignando una clave única a cada espécimen, ejemplo: **SABE001**. La numeración no debe repetirse en ningún ejemplar dentro de cada familia.
4. Una vez tomado el tejido y colocado en el tubo, el tejido se debe cubrir completamente con etanol al 96%.
5. Finalizada la toma de tejido, los tubos se deben sellar con parafilm y mantener en congelación (o en su defecto, en refrigeración) hasta el momento del envío a su secuenciación.

Tiempo para procesar muestras una vez recibidas: dos semanas.

7.8 ALMACENAMIENTO DE NUESTRAS IDENTIFICADAS: ENVÍO DE MUESTRAS PARA SU DEPÓSITO DEFINITIVO EN SU COLECCIÓN ORIGINAL (CADENA DE CUSTODIA)

Los poliquetos identificados a nivel de especie serán almacenados en viales de vidrio de diferente capacidad, usando la etiqueta a nivel de especie: nombre científico, autoridad, año y siglas del identificador.

Las especies identificadas tendrán que regresarse a su colección original, según corresponda.

Cada responsable debe llenar el formato de cadena de custodia (**Anexo 7**) y enviarlo junto con las muestras que está regresando. A su vez, el receptor debe llenar lo que le corresponde,

escanear y mandar de regreso vía correo electrónico al colega que regresa las muestras.

8. REPOSITORIO DIGITAL

Las bases de datos (archivos en Excel) por grupo de trabajo se almacenarán en la plataforma Teams con acceso a los participantes del proyecto, quienes podrán actualizar sus bases de datos, pero no las de otros colegas. Si tienen observaciones de una base de datos de otro colega, le harán saber al responsable los cambios necesarios para que sea él o ella quién los haga. Las plantillas de los **anexos 12, 13 y 14** están disponibles en formato Excel a solicitud con cualquiera de los autores de este manual.

- ✓ **Anexo 12.** Biota portuaria
- ✓ **Anexo 13.** SpecimenData_v3Transitional
- ✓ **Anexo 14.** Image Data

9. FORMACIÓN DE PERSONAL

El personal involucrado en los muestreos, separación y determinación taxonómica de la biota portuaria deberá estar capacitado y/o capacitarse en el uso y aplicación del protocolo.

Para ello, los investigadores responsables de cada institución deberán capacitar a sus asistentes con el uso y aplicación del protocolo, preferentemente en el marco de un curso o taller. Asimismo, el curso será grabado para usuarios futuros.

Además, los asistentes deberán seguir un entrenamiento especializado en la identificación de grandes grupos taxonómicos, familias y especies de poliquetos, uso de equipo de laboratorio, análisis de datos, y seguridad de campo.



Foto: Humberto Bahena- Basar

10. EVALUACIÓN DEL PROGRAMA BIOTA PORTUARIA

El progreso y la calidad del programa deben ser frecuentemente evaluados, para asegurar que los objetivos del proyecto se estén cumpliendo. Para ellos se hará una reunión virtual con los responsables de cada institución para comprobar que:

- ✓ Los muestreos y separación de material ocurren en el lapso planeado.
- ✓ Disponibilidad del personal.
- ✓ Las bases de datos de Excel están siendo completada correctamente.
- ✓ Las hojas de cadenas de custodia están siendo llenadas correctamente.
- ✓ Los resultados están listos en la fecha determinada.

11. PRESENTACIÓN DE RESULTADOS

Los resultados consisten en informes institucionales e individuales.

Informes institucionales

- ✓ Dos reportes de muestreos (**Anexo 10**): primer muestreo y segundo muestreo.
- ✓ Dos bases de datos en Excel (**Anexo 12**): primer muestreo y segundo muestreo.

Informes individuales

- ✓ Bases de datos de Excel (**Anexo 12**, solo la hoja 3): especies de poliquetos identificadas por cada taxónomo.

12. AGRADECIMIENTOS

Este protocolo ha sido producto de más de una década de muestreos en marinas y puertos de México, en el que el ensayo y error ha permitido una mejoría constante. En ese ir y venir, fue determinante el trabajo de campo y laboratorio de muchos colegas y a ellos brindamos nuestro agradecimiento: Beatriz Yáñez Rivera, Nuria Méndez Ubach, Tulio F. Villalobos-Guerrero, José María Aguilar Camacho, Irving D. Ramírez Santana, Francisco Melchor, Humberto Bahena Basave, José Salgado Barragán y Sergio Rendón. En los muestreos realizados en el año 2021 fueron de gran apoyo los esfuerzos de Victor Conde Vela, Anabel León Hernández, José Angel García Trasviña, Sara Berenice Balan Zetina, Marina Mondragón-Rojas, Esmeralda Morales-Domínguez, Christopher Cruz Gómez, Alejandro Vega Zepeda, Emilia González-Vallejo, Raúl Eduardo Gámez Benavides, Julio Daniel Gómez-Vázquez, Juan Pablo Sánchez Ovando, Israel Rojo Ramos, Ofir Molina González, Cecilia Castañeda Trujillo y Gerardo Góngora Garza. Asimismo, el calado de este protocolo y los comentarios de Marina Mondragón Rojas y Esmeralda Morales Domínguez (CICESE) contribuyeron en gran medida a mejorar esta versión. Gran parte de las fotografías incluidas en este documento fueron tomadas con el lente de Humberto Bahena-Basave, CECOSUR-Chetumal. Este protocolo recibió financiamiento del Fondo Sectorial SEMARNAT-CONACYT A3-S-73811.

13. REFERENCIAS

- Comité Asesor Nacional sobre Especies Invasoras. 2010. Estrategia nacional sobre especies invasoras en México, prevención, control y erradicación. CONABIO, SEMARNAT, CONANP, México, 114 pp.
- Diario Oficial de la Federación (DOF). 2016. Lista de las especies exóticas invasoras para México. 07 de diciembre de 2016.
- Diario Oficial de la Federación (DOF). 2017. Decreto Promulgatorio del Convenio Internacional para el Control y la Gestión del Agua de Lastre y los Sedimentos de los Buques, adoptado en Londres, el trece de febrero de dos mil cuatro, en el marco de la Organización Marítima Internacional (OMI).
- Harris LH, de León-González JA & Salazar-Vallejo SI. 2021. Morfología, métodos, clave para familias y clasificación. En: Anélidos Marinos de México y de América Tropical. De León-González JA, Bastida-Zavala JR, Carrera-Parra LF, García-Garza ME, Salazar-Vallejo SI, Solís-Weiss V y Tovar-Hernández MA (Eds). Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey, México. Capítulo 2: 9–39 pp.
- Salazar-Vallejo, S. I., Carrera-Parra, L. F., González-Vallejo, N. E. & Salazar-González, S. A. 2014. Biota portuaria y Sistemática. En: Low Pfeng, A.; P. Quijón y E. Peters. (Eds.). SEMARNAT, INECC, UPEI. Capítulo 2: 33–54 pp.

14. GLOSARIO

- Andadores** Son las plataformas o muelles flotantes que sirven para el atraque de embarcaciones turísticas, recreativas y deportivas, y que conectan con la infraestructura terrestre, por lo que también funcionan como vías de acceso peatonal.
- Marinas turísticas** Conjunto de instalaciones marítimas destinadas a la protección, el abrigo y la prestación de toda clase de servicios a las embarcaciones de recreo, turísticas y deportivas, de cualquier bandera e independiente de su tamaño, así como a los visitantes y usuarios de ellas, nacionales o extranjeros.
- Muertos:** Dispositivos permanentes compuestos por un elemento de gran peso apoyando en el fondo, con una línea de fondeo y una boya. Estos dispositivos permiten fondear una embarcación de forma segura sin el uso de la ancla
- Puertos de altura** Puertos habilitados para enviar y recibir embarcaciones, personas y bienes entre puertos nacionales e internacionales.
- Puertos de cabotaje** Puertos habilitados para enviar y recibir embarcaciones, personas y bienes entre puertos solo de México.



ANEXOS



**DESCARGA LOS
ANEXOS**

ANEXO 1 IDENTIFICADOR ÚNICO

Las muestras contarán con un identificador único en el que se indica la localidad usando el código de tres letras para marinas y puertos o 4 letras para ANPs (ver **Anexo 4**)—andador (A), boya (B) o metabarcoding (M)—año (4 dígitos), mes (dos dígitos) y día (dos dígitos)—número de muestra (1-9 en caso de muestreo cuantitativo; 1 en adelante para selectivos).

Ejemplo	Explicación
HUX-A-Q-20210826-3	La muestra es de Huatulco. Fue tomada en un andador de la marina turística. Proviene de un muestreo cuantitativo. Se recolectó el 26 de agosto del 2021. Corresponde a la réplica 3.
HUX-A-M-20210826	La muestra es de Huatulco. Fue tomada en un andador de la marina turística. Proviene del muestreo para metabarcoding. Se recolectó el 26 de agosto del 2021.
HUX-S-20210826-1	La muestra es de Huatulco. Proviene de un muestreo selectivo. Se recolectó el 26 de agosto del 2021. Corresponde a la muestra 1.
SCX-B-Q-20210826-6	La muestra es de Salina Cruz. Fue tomada en una boya del puerto. Proviene de un muestreo cuantitativo. Se recolectó el 26 de agosto del 2021. Corresponde a la réplica 6 (muelle intermedio).
ISMA-S-20210826-2	La muestra es del Parque Nacional Isla Marietas. Muestreo selectivo. Se recolectó el 26 de agosto del 2021. Corresponde a la muestra 2.

ANEXO 2 HOJA DE CAMPO

- El siguiente formato deberá imprimirse cuantas veces sea necesario, pues servirá de apoyo en el trabajo de campo. Se debe copiar y pegar el formato en un archivo nuevo para garantizar que ocupe una sola página, y con ello facilitar su impresión y manejo en el campo.
- La fecha indicará el año (4 dígitos), el mes (2 dígitos) y el día (2 dígitos). Ejemplo: 2020/08/26.
- Los recolectores serán indicados con sus iniciales. Por ejemplo, el código LFCP corresponde a Luis Fernando Carrera Parra, quien deberá estampar también su firma.
- Los parámetros adicionales son opcionales, dependiendo de la sonda o equipo de medición de cada una de las instituciones participantes.
- En observaciones indicar lo que considere importante; por ejemplo, si se tomaron fotografías de la zona de estudio, modelo de la sonda, o si los parámetros fueron estimados con instrumentos individuales (termómetro, pH-metro, salinómetro), etc.
- Indicar las iniciales y firma del responsable de toma de datos, manejo de muestras y llenado de información.

Biota portuaria México				
Fecha 0000/00/00	Hora am/pm	Localidad (Código IATA o ANP)	Sitio (Nombre particular)	ID. único
Latitud N		Longitud W		
Tipo de muestreo (Cuantitativo, selectivo y/o metabarcoding)	No. Réplicas (1, 2, 3)	Tipo de Sustrato (material) (Cabo, pilote, andador, boya, barco, basura flotante, etc)	Profundidad (selectivo) (metros)	Recolectores (iniciales con apellidos y firma)
Salinidad	Temperatura	pH	Parámetros adicionales	
Observaciones				
Responsable de toma de datos, manejo de muestras y llenado de información: (iniciales con apellidos y firma)				

ANEXO 3 CÓDIGOS PARA RECOLECTORES, TAXÓNOMOS Y FOTÓGRAFOS

Se utilizarán las iniciales de los recolectores y taxónomos.

Aumentar filas en la tabla tantas como sean necesarias para otros recolectores y asistentes de campo.

Nombre	Código
Luis Fernando Carrera-Parra	LFCP
Patricia Salazar-Silva	PSS
Víctor Hugo Delgado-Blas	VHDB
Daniel Pech-Pool	DPP
Jesús Ángel de León-González	JADLG
J. Rolando Bastida-Zavala	JRBZ
María Elena García-Garza	MEGG
Sergio I. Salazar-Vallejo	SISV
Victoria Díaz-Castañeda	VDC
María Ana Tovar-Hernández	MATH
Cristian M. Galván-Villa	CGV
José Ángel García-Trasviña	JAGT

ANEXO 4 ETIQUETAS PARA FRASCOS

(45 ml, 125 ml, 250 ml, 500 ml, 1 lt)

Cada muestra debe una etiqueta interna (papel resitall).

INDICACIONES PARA ETIQUETAS INTERNAS DE FRASCOS

1. El tamaño para etiquetas de frascos es de 3.5 cm de ancho por 6 cm de largo.
2. Las etiquetas requieren impresión láser en papel alcohol (papel resitall). Este papel conserva su resistencia en condiciones húmedas durante un largo período de tiempo sin desintegrarse o perder datos. Se recomienda copiar y pegar el formato en un archivo separado, y llenar una hoja tamaño carta con cuantas etiquetas quepan para imprimir la plantilla completa y no desperdiciar la hoja resitall.
3. Estas etiquetas pre-elaboradas se llevarán a los muestreos, por lo que es necesario llevar la cantidad necesaria para los muestreos. Se deben llevar cortadas y en un contenedor plástico con tapa (toper).
4. Se usarán plumones de tinta a prueba de agua y alcohol (water proof and fade proof, 0.25 mm grosor línea). En su defecto usar lápiz marca Mirado #2.5.
5. Como el proyecto se enfoca en el grupo de los poliquetos, se utilizará una etiqueta de color rojo en la tapa del frasco, lo que permitirá distinguir los lotes de poliquetos de los otros taxa y agilizará búsquedas posteriores. En su defecto, se recomienda una marca con un trozo de cinta gris o canela en la tapa.
6. **NOTA:** Si la muestra fue en fijada en FORMOL, se deberá palomear el espacio de FORMOL independientemente de que la muestra se haya lavado y transferido a etanol para su preservación. Esto permitirá claramente diferenciar las muestras que fueron fijadas en formol o en etanol, y garantizar su éxito en los estudios moleculares.

BIOTA PORTUARIA MEXICO	
ID_____	
TAXON_____	
OH___Formol___Col._____	

ETIQUETAS PARA VIALES

Viales de vidrio: 15 X 45 mm (1 dram) y viales de plástico con tapa de rosca: 3 ml, 15 ml, 45 ml

1. El tamaño para etiquetas de viales es de 2 cm de ancho X 3.5 cm de largo, o dependiendo del tamaño de los viales a usar.
2. Usar el código de cuatro letras para las familias de poliquetos.
3. Estas etiquetas se utilizarán básicamente para la separación a nivel familia, pero su uso se puede extender a otros taxa que así lo requieran. Se deben llevar al campo, pues ahí se hará una identificación preliminar a nivel de familia.

ANEXO 5 CÓDIGOS PARA FAMILIAS DE POLIQUETOS

Se utilizará el código de cuatro letras de Salazar-Vallejo et al (1989), actualizada por Harris et al (2021) para cada familia. En la mayoría de las familias ese código corresponde con las primeras cuatro letras del nombre (ejemplo: el código para Orbiniidae es ORBI. Las excepciones son:

- Ampharetidae: AMPA
- Amphinomidae: AMPI
- Polynoidae: POLN
- Polyodontidae: POLO
- Sabellariidae: SABI

A continuación solo se muestran los códigos para 12 familias, el resto pueden consultarse en el capítulo I, volumen I, páginas 37-39 del libro Anélidos Marinos de México y América Tropical disponible en:

<http://eprints.uanl.mx/22161/19/22161-1.pdf>

Familia	Código
Amphinomidae	AMPI
Cirratulidae	CIRR
Eunicidae	EUNI
Hesionidae	HESI
Flabelligeridae	FLAB
Lumbrineridae	LUMB
Nereididae	NERE
Oeonidae	OENO
Polynoidae	POLN
Sabellidae	SABE
Serpulidae	SERP
Spionidae	SPIO



ANÉLIDOS MARINOS DE MÉXICO Y AMÉRICA TROPICAL

ANEXO 6 CADENA DE CUSTODIA PARA MUESTRAS DE INVERTEBRADOS BENTÓNICOS

ID Muestra	Fecha de recolecta (día/mes/año)	Nombre y firma del recolector	Fecha de entrega al laboratorio (día/mes/año)	Nombre y firma del responsable de la entrega al laboratorio	Nombre y firma del receptor	Comentarios

ANEXO 7 CADENA DE CUSTODIA PARA ENVIO-RECEPCION DE MUESTRAS DE METABARCODING, BARCODING Y POLIQUETOS

Este formato aplica tanto para la muestra del metabarcoding, los ejemplares para el Código de Barras, y las familias de poliquetos a identificar a nivel de especie por los taxónomos.

Indicaciones:

- ✓ El que envía debe adjuntar esta hoja impresa en el paquete. El que recibe llena los datos, escanea el formato y lo reenvía al correo electrónico de quien envía.
- ✓ Comentarios: deberá indicar cualquier asunto referente a las muestras recibidas (estado de la muestra o de la etiqueta, del contenedor, inconsistencias en el número de lotes, etc).
- ✓ Debe indicar el ID único de todas de las muestras que se envían.
- ✓ El que envía debe mandar por correo electrónico al receptor y la Base de Datos de Excel "Biota Portuaria" con la información asociada a las muestras.

Fecha de envío (día/mes/año)	Nombre y firma del responsable del envío	Fecha de recepción	Nombre y firma del receptor	Número total de lotes	Comentarios
<p>ID MUESTRAS</p>					

ANEXO 8 CADENA DE CUSTODIA PARA CURACION Y SEPARACION DE MUESTRAS A GRANDES GRUPOS

ID Muestra	Fecha de curación (día/mes/año)	Nombre y firma del responsable	Fecha de inicio de la separación (día/mes/año)	Fecha de término de la separación (día/mes/año)	Nombre y firma del responsable	Comentarios

ANEXO 9 CADENA DE CUSTODIA PARA CURACIÓN Y SEPARACIÓN DE MUESTRAS A NIVEL FAMILIA (POLIQUETOS)

ID Muestra	Fecha de curación (día/mes/año)	Nombre y firma del responsable	Fecha de inicio de la separación (día/mes/año)	Fecha de término de la separación (día/mes/año)	Nombre y firma del responsable	Comentarios

ANEXO 10 REPORTE DE MUESTREOS EN MARINAS TURÍSTICAS, PUERTOS Y ANPS

El informe por institución consta de dos archivos.

- a. Excel (base de datos).
 - b. Word (tabla resumen, mapa y 5 fotografías). Use a) hoja tamaño carta, b) márgenes 2.5 cm x lado, c) letra Times New Roman tamaño 14.
- EJEMPLO:

Informe de muestreo en La Cruz de Huanacastle, Puerto Vallarta y Parque Nacional Islas Marietas

Instituto Tecnológico de Bahía Banderas

Fecha: día/mes/año

Elaboró: Patricia Salazar-Silva

Tabla resumen	
Fechas de muestreo	Indique el inicio y fin (02 febrero-9 febrero 2021)
Número total de localidades muestreadas (puertos, marinas, ANP's)	
Nombres de las localidades	
Participantes	Nombres completos en orden alfabético

1. Inserte un mapa de Google Earth con las localidades muestreadas. Indique el número de localidad (el que asignó en la base de datos de Excel) y en la leyenda escriba el nombre de la localidad.
2. Inserte un máximo de 5 fotografías con su respectiva leyenda.

ANEXO 11 ELABORACIÓN O ADECUACIÓN DE EQUIPO Y MATERIALES DE CAMPO

A) Bastidor y bolsa recolectora de muestras

La bolsa recolectora está sujeta a un bastidor de policloruro de vinilo (PVC) en forma de media luna. El bastidor se construye con tubos de PVC de 1/2", dos codos de 45° y pegamento para PVC. Tiene un extremo lineal de 44 cm. El arco se forma mediante calentamiento lento para unir ambos extremos, formando un radio de 15.5 cm. La bolsa recolectora que cubre el bastidor de soporte debe ser elaborada con manta cruda 100% algodón. Debe medir 50 cm de largo y la bastilla superior o dobladillo deben ser reforzado y sus bordes deben ser costurados de modo tal que se evite su deshilo. La malla se inserta en el bastidor de policloruro de vinilo (PVC) (Figura 7 A-B). Se recomienda llevar al muestreo un bastidor con su respectiva bolsa recolectora de reemplazo.



Figura 7. Materiales de muestreo. A) Bastidor con bolsa recolectora, B) bastidor y marco cuadrado,

B) Cuadro de PVC

Se construye con tubos de PVC de 1/2", cuatro codos de 45° y pegamento para PVC. Cada lado debe medir 25 cm. Previo a unir los lados, los tubos de PVC deben perforarse con un taladro para que

no floten tanto y puedan maniobrarse fácilmente dentro del agua. Se recomienda llevar al campo uno de reemplazo.

C) Bolsas recolectoras

Deben ser elaboradas con manta cruda 100% algodón, de 40 x 40 cm, con jareta de algodón de 2 mm 100% algodón. Sus bordes deben ser costurados de modo tal que se evite su deshilo.

D) Cubetas

Cada cubeta debe tener una etiqueta que deberá medir 4 x 4 cm, de color blanco, plastificadas (enmicadas) y sujetas con un cincho plástico al asa metálica de la cubeta. Con un plumón indeleble se escribirá sobre la etiqueta: andador externo, andador intermedio o andador interno, según corresponda.

E) Formón y/o espátula

Se debe colocar una cuerda a la agarradera o mango de la espátula y formón para atarlos a la muñeca del recolector para evitar la pérdida durante las maniobras, y llevar al muestreo por lo menos un par más de reemplazo.

F) Guantes de neopreno

Las personas que asistirán en los muestreos deben utilizarlos en la recolección de las muestras, pues los ostiones, verméticos y balanos pueden ocasionar cortaduras en la piel.

G) GPS (Sistema de Posicionamiento Global)

Si no se dispone de un GPS, se podrían utilizar los teléfonos celulares inteligentes para el registro de coordenadas por medio de la función brújula o alguna aplicación GPS que proporcione coordenadas y orientación.

ANEXO 12 PORTUARIA MEXICO

Hoja 1

PORTUARIA MEXICO: HOJA DE CAMPO								
No.	Id Unico	Localidad	Sitio	Hora	Latitud N	Longitud W	Sustrato	Profundidad
1								
2								
3								
4								

(Continuación)PORTUARIA MEXICO: HOJA DE CAMPO						
Recolectores	Salinidad	Temperatura	pH	Parametros adicionales	Fotografias	Observaciones

- ✓ Los datos de la hoja de campo deberán capturarse en esta hoja (son los mismos).
- ✓ Se deberá asignar un id único localidad que debe ser en orden consecutivo y de acuerdo a los días en que se hicieron los muestreos.
- ✓ Las coordenadas geográficas deben ir en grados, minutos y segundos. Ejemplo: 23°12'34.59"N, 106°25'23.05"W.
- ✓ Registro fotográfico. Indicar el rango de fotos que se tomaron por localidad (Ejemplo: fotos 01-18).

Hoja 2

BIOTA PORTUARIA MEXICO: PRESENCIA-AUSENCIA DE FAMILIAS DE POLIQUETOS				
Familias	Localidad 1	Localidad 2	Localidad 3	Localidad 4
Amphinomidae				
Cirratulidae				
Eunicidae				
Hesionidae				
Flabelligeridae				
Lumbrineridae				
Nereididae				
Oeonidae				
Polynoidae				
Sabellidae				
Serpulidae				
Spionidae				

- ✓ **Agregar tantas familias como sean necesarias en orden alfabético**
- ✓ En esta hoja se debe indicar la presencia/ ausencia (0/1) de cada familia de poliquetos encontrada por localidad.
- ✓ Las familias deben ir en orden alfabético, insertar tantas filas como sean necesarias.

Hoja 3

BIOTA PORTUARIA MEXICO: ABUNDANCIA DE ESPECIES DE POLIQUETOS POR FAMILIA COMPROMETIDA					
	Localidad 1	Localidad 2	Localidad 3	Localidad 4	Localidad 5
Amphinomidae					
Cirratulidae					
Eunicidae					
Hesionidae					
Flabelligeridae					
Lumbrineridae					
Nereididae					
Oeonidae					
Polynoidae					
Sabellidae					
Serpulidae					
Spionidae					

- ✓ En esta hoja se concentrarán las especies que cada taxónomo identificó en su respectiva familia.
- ✓ En la etapa I no se comprometieron nombres de especies, así que no se debe llenar la hoja 3 en el primer reporte.
- ✓ Los géneros y especies deben ir en orden alfabético y con su respectivo autor y año.
- ✓ Agregar cuantas filas sean necesarias.
- ✓ Se debe indicar la abundancia de cada especie por localidad (no considerar fragmentos, solo ejemplares con región anterior).
- ✓ El responsable de cada institución deberá solicitar la información a los taxónomos de cada familia e incorporarla en esta tabla general por institución. Pues cada investigador por institución deberá entregar su base de datos completa a la entrega parcial de resultados y a la entrega final del proyecto.

ANEXO 13

Hoja 1

Specimen Info Metadata				
Sample ID	Field ID	Museum ID	Collection Code	Institution Storing
ECOSUR-OH-P1022		ECOSUR-OH-P1022	ECOSUR-OH	El Colegio de la Frontera Sur, Unidad Chetumal

Hoja 2

Taxonomy Metadata								
Sample ID	Phylum	Class	Order	Family	Subfamily	Genus	Species	Identifier
ECOSUR-OH-P1022	Annelida	Polychaeta	Eunicida	Oeonidae		Oenone	sp LFCP-1	Luis F. Carrera-Parra

(Continuación) Taxonomy Metadata				Extended Fields (BOLD 3.1)	
Identifier Email	Identifier Institution	Identification Method	Taxonomy Notes		
lcarrera@ecosur.mx	El Colegio de la Frontera Sur, Unidad Chetumal	Morphological			

Hoja 3

Specimen Details Metadata					
Sample ID	Sex	Reproduction	Life Stage	Extra Info	Notes
ECOSUR-OH-P1022					In sabellarid reef

(Continuación) Specimen Details Metadata Extended Fields (BOLD 3.1)				
Voucher Status	Tissue Descriptor	Associated Taxa	Associated Specimens	External URLs
vouchered, registered collection	Tissue from parapodium			

Hoja 4

Collection Info Metadata												
Sample ID	Collectors	Collection Date	Country/ Ocean	State/ Province	Region	Sector	Exact Site	Latitude	Longitude	Elevation	Depth	Elevation Precision
ECOSUR-OH-PI022	Salazar-Vallejo, S.I. & Carrera-Parra, L.F.	March 4, 2009	Pacific	Guerrero	Acapulco		Angosta beach	16.841917°	-99.915092°		2.5 m	

(Continuación) Collection Info Metadata Extended Fields (BOLD 3.1)									
Depth Precision	GPS Source	Coordinate Accuracy	Event Time	Collection Date Accuracy	Habitat	Sampling Protocol	Collection Notes	Site Code	Collection Event ID
					Marine				

✓ **Nota:** La fila 2 muestra un ejemplo de los datos mínimos indispensables de llenado.

ANEXO 14

Image File	Original Specimen	View Metadata	Caption	Measurement	Measurement Type	Sample Id	Process Id
ECOSUR-OH-PI022.jpg	Yes	Dorsal	Complete specimen			ECOSUR-OH-PI022	

License Holder	License	License Year	License Institution	License Contact	Photographer
Creative Commons	2009	El Colegio de la Frontera Sur	hbahena@ecosur.mx	Humberto Bahena	

✓ **Nota:** La fila 2 muestra un ejemplo de los datos mínimos indispensables de llenado.



UANL

