

RECOLECCIÓN Y PRESERVACIÓN DE MUESTRAS PARA LA MEDICIÓN DE VARIABLES DEL SISTEMA DE CO₂ EN AGUAS MARINO - COSTERAS



REMARCO
REMARCO-AO-P-01
V.01

Octubre, 2021

Elaborado por:

Celeste Sánchez-Noguera - CIMAR-UCR, Costa Rica.

Edición:

César A. Bernal - INVEMAR, Colombia

Comité Ejecutivo de REMARCO

Representante de Acidificación de Océanos

Cesar Augusto Bernal
Instituto de Investigaciones Marinas y Costeras "José Benito Vives de Andrés" – INVEMAR
COLOMBIA

Representante de Contaminación Química

Ana Carolina Ruiz-Fernández
Universidad Nacional Autónoma de México – UNAM.
MÉXICO

Representante de Floraciones Algales

Benjamin Suarez Isla
Universidad de Chile (LABTOX-UCHILE).
CHILE

Representante de Microplásticos

Denise Delvalle Borrero
Universidad Tecnológica de Panamá
PANAMÁ

Representante de Comunicaciones

Laura Brenes Alfaro.
Centro de Investigación en Contaminación Ambiental – CICA.
COSTA RICA

EQUIPO IAEA

Project Management Officer RLA/7/025

Magali Zapata Cazier
Organismo Internacional de Energía Atómica - OIEA

Technical Officer RLA/7/025

Carlos Manuel Alonso Hernández
Organismo Internacional de Energía Atómica - OIEA

Imagen de portada: Materiales y equipos empleados para la recolección de muestras del sistema de CO₂ - INVEMAR.

Foto: Erix Granados.

Citar como:

Sánchez-Noguera, C. (2021). Recolección y preservación de muestras para la medición de variables del sistema de CO₂ en aguas marino - costeras. Red de Investigación de Estresores Marinos - Costeros en Latinoamérica y El Caribe – REMARCO. Santa Marta, Colombia. 17 pp. <https://remarco.org/manual-ao/>

REMARCO agradece al Organismo Internacional de Energía Atómica (OIEA) el soporte para la elaboración del presente documento, a través del proyecto de Cooperación Técnica RLA/7/025.

Este material no tiene fines de lucro. Se prohíbe su venta. Todos los derechos reservados. Se autoriza la reproducción y difusión del contenido de este producto para propósitos educativos u otros fines no comerciales, sin previa autorización escrita de los titulares de los derechos de autor, siempre que se especifique claramente la fuente.

TABLA DE CONTENIDO

1	OBJETIVO	4
2	ALCANCE.....	4
3	FUNDAMENTO TEÓRICO	4
4	MATERIALES, REACTIVOS Y EQUIPOS.....	5
4.1	MATERIALES	5
4.2	REACTIVOS.....	5
4.3	EQUIPOS.....	6
5	DESCRIPCIÓN DE ACTIVIDADES.....	6
5.1	CONSIDERACIONES GENERALES.....	6
5.2	RECOLECTA DE MUESTRAS: CON EQUIPO MUESTREADOR	9
5.3	RECOLECTA DE MUESTRAS: SIN EQUIPO MUESTREADOR – BOTELLA EN SUPERFICIE	11
5.4	RECOLECTA DE MUESTRAS: SIN EQUIPO MUESTREADOR - MUESTREO DE FONDO (BUCEO SCUBA) 12	
5.5	ALMACENAMIENTO Y DOCUMENTACIÓN	13
6	DOCUMENTOS DE REFERENCIA.....	14
7	ANEXOS	15

1 OBJETIVO

Establecer el procedimiento de recolección y preservación de muestras de agua de mar para la medición de variables del sistema de carbonatos.

2 ALCANCE

Las muestras de agua de mar recolectadas y preservadas de acuerdo con lo indicado en este protocolo permiten realizar mediciones de tres parámetros del sistema de carbonatos: alcalinidad total (A_T), carbono inorgánico disuelto (C_T) y pH. Según la metodología del indicador 14.3.1 de los Objetivos de Desarrollo Sostenible, en sistemas con alta variabilidad como los ambientes costeros, las mediciones de estos parámetros pueden tener una calidad de categoría dos (categoría tiempo) y son válidas para realizar inferencias y predicciones a corto plazo. Esta categoría requiere una desviación estándar relativa dentro de un rango de 10% para la concentración del ion carbonato (utilizado para calcular el estado de saturación). Esto implica una incertidumbre aproximada de 10 $\mu\text{mol kg}^{-1}$ en A_T y C_T y 0.02 en pH (Intergovernmental Oceanographic Commission, 2019).

Actualmente existen varios recursos disponibles como guía para la recolección y preservación de muestras de agua de mar para estudiar el sistema de carbonatos, pero muchos de estos documentos fueron elaborados para condiciones de muestreo y análisis desde buques oceanográficos y en mar abierto. En la actualidad, sólo un documento de la Environmental Protection Agency incluye lineamientos para muestreo en ambientes costeros, los cuales están sujetos a una alta variabilidad natural. El presente protocolo elaborado por la Red de Investigación de Estresores Marinos-Costeros en Latinoamérica y el Caribe (REMARCO) compila lineamientos de buenas prácticas y aporta sugerencias para las particularidades del muestreo en zonas costeras, tomando en consideración los recursos disponibles en la región de Latinoamérica y el Caribe. Este protocolo incluye varias alternativas de recolección de muestras considerando diversos métodos de análisis (pH: espectrofotometría, A_T : titulación con celda abierta y cerrada, C_T : detección de radiación infrarroja), pero puede ser necesario adecuarlas de acuerdo con el equipo de análisis disponible en el laboratorio. Dado que no todas las alternativas propuestas en este protocolo han sido validadas, se recomienda que toda publicación científica incluya una descripción detallada de las metodologías de muestreo utilizadas y una referencia a este documento.

3 FUNDAMENTO TEÓRICO

El sistema de carbonatos en una muestra de agua es afectado por cambios en la concentración de las especies químicas, por lo que es importante seguir recomendaciones específicas durante el proceso de recolección, preservación y manipulación de las muestras. El intercambio gaseoso con la atmósfera y la actividad biológica son dos de los principales responsables de los cambios en las propiedades de la muestra de agua. Por eso se debe recolectar la muestra en una botella de vidrio de borosilicato, limpia y con cierre hermético, para minimizar al máximo el intercambio gaseoso con la atmósfera. Adicionalmente, la muestra se preserva con una solución de cloruro de mercurio (II) para prevenir la actividad biológica después de la recolección.

4 MATERIALES, REACTIVOS Y EQUIPOS

4.1 Materiales

- ✓ Planilla de campo.
- ✓ Botella de borosilicato de alta calidad para muestra del sistema de carbonatos (las especificaciones difieren de acuerdo con el parámetro a medir, ver sección 6.1.1).
- ✓ Botella/vial de plástico de 20-25 mL para muestra de salinidad (o sonda multiparamétrica para medir *in situ*).
- ✓ Recipiente plástico oscuro (botella o vial) para muestra de nutrientes (el volumen requerido difiere de acuerdo con el equipo de medición disponible en cada laboratorio, por lo tanto, no se especifica en este protocolo).
- ✓ Grasa de silicón de alto vacío (e.g. Apiezon® L).
- ✓ Guantes de nitrilo libres de talco.
- ✓ Hielera con hielo.
- ✓ Jeringa plástica de 10 mL (para ajustar el espacio de aire).
- ✓ Jeringa plástica de 60 mL (C_T).
- ✓ Manguera flexible de 40 cm (el diámetro debe coincidir con la válvula de purga del muestreador), de silicón para muestras de C_T y preferiblemente marca Tygon® para las otras muestras.
- ✓ Dos mangueras de silicón de 10 cm (el diámetro debe coincidir con el portafiltro y la jeringa).
- ✓ Portafiltro y filtro de microfibras de vidrio GF/F de 0.7 μm , previamente secado en horno de mufla (480 °C x 8 h) (C_T).
- ✓ Papel toalla.

4.2 Reactivos

- ✓ Agua destilada/desionizada
- ✓ Ácido clorhídrico (HCl) 37% (No. CAS 7647-01-0).
- ✓ Cloruro de mercurio (II) (HgCl_2) grado analítico (No. CAS 7487-94-7).
- ✓ Cloruro de zinc (ZnCl_2) grado analítico (No. CAS 7646-85-7).

4.2.1 Preparación de solución saturada de cloruro de mercurio (II) (HgCl_2) (100 mL)

Debido al nivel de toxicidad del HgCl_2 , siempre se deben utilizar guantes de nitrilo libres de talco durante su manipulación.

- a. Agregar 10.0 g de HgCl_2 en 100 mL de agua destilada/desionizada en un vaso de precipitado.
- b. Mezclar con agitador de vidrio o agitador magnético.
- c. Guardar la solución preparada en un recipiente sellado, debidamente rotulado y en lugar fresco a temperatura ambiente.
- d. Verificar si hay formación de cristales en el fondo del recipiente, para comprobar que la solución permanece saturada.
- e. Enjuagar exhaustivamente con agua destilada toda la cristalería y materiales que estuvieron en contacto con el HgCl_2 .
- f. Desechar los residuos siguiendo el protocolo de su laboratorio.

4.2.2 Preparación de ácido clorhídrico (HCl) al 10% (1000 mL)

- Agregar 729.7 mL de agua destilada/desionizada en un vaso de precipitado de 2 L.
- En baño de agua fría (o una campana de extracción), agregar 270.3 mL de HCl (37%) al vaso de precipitado y mezclar con agitador de vidrio o agitador magnético hasta conseguir una solución homogénea.
- Guardar la solución preparada en un recipiente sellado, debidamente rotulado y en lugar fresco a temperatura ambiente.

4.2.3 Preparación de cloruro de zinc ($ZnCl_2$) al 50% de saturación (100 mL)

Reactivo alternativo para preservar muestras, si en su laboratorio o país hay restricciones para el uso del $HgCl_2$. Sin embargo, este método no es común en la comunidad que trabaja con el sistema de carbonatos y no se recomienda su uso sin un procedimiento validado que garantice la idoneidad de resultados.

- Agregar 50 g de $ZnCl_2$ en 100 mL de agua destilada/desionizada en un vaso de precipitado.
- Mezclar con agitador de vidrio o agitador magnético.
- Guardar la solución preparada en un recipiente sellado, debidamente rotulado y en lugar fresco a temperatura ambiente.
- Enjuagar exhaustivamente con agua destilada toda la cristalería y materiales que estuvieron en contacto con el $ZnCl_2$.
- Desechar los residuos siguiendo el protocolo de su laboratorio.

4.3 Equipos

- ✓ Botella Niskin u otro muestreador (volumen mínimo del muestreador: 1.5 L de capacidad por cada 250 mL de muestra requerida).

Nota 1: En las secciones 5.3 y 5.4 se describe la recolecta de muestra directa sin uso de muestreador, desde la superficie (e.g. directamente desde una plataforma o en zonas intermareales) o por medio de buceo SCUBA.

- ✓ Micropipeta con capacidad para dispensar 45-200 μ L o gotero previamente verificado (se determina en el laboratorio la cantidad de gotas necesarias para dispensar el volumen requerido).
- ✓ Termómetro o sonda para medir temperatura (opcional: medidor con sonda para medir temperatura y salinidad).
- ✓ Sonda para medir oxígeno disuelto (opcional).
- ✓ GPS

5 DESCRIPCIÓN DE ACTIVIDADES

5.1 Consideraciones generales

5.1.1 Recipiente para muestras

El volumen de muestra requerido y el tipo de recipiente pueden variar de acuerdo con el equipo de

medición disponible en cada laboratorio.

- ✓ **pH:** botella de vidrio borosilicato de alta calidad (≥ 125 mL) con tapón esmerilado.
- ✓ **A_T:** botella de vidrio borosilicato de alta calidad (250 mL) con tapón esmerilado.
- ✓ **C_T:** botella de vidrio borosilicato de alta calidad (250 mL) con tapón esmerilado o viales ámbar de borosilicato (40 mL) que toleren temperaturas >450 °C x 8h y tapa de rosca con septas de PTFE (Teflón®).

Nota 2: Las botellas de borosilicato de alta calidad con tapón esmerilado son de alto costo y no siempre fáciles de conseguir. Como alternativa para las muestras de AT y CT, se sugiere el uso de botellas de borosilicato con tapa de rosca con sello hermético (Figura 1, Anexos). Está pendiente evaluar la eficacia de este tipo de botellas en mantener la estabilidad de la muestra a largo plazo (> 1 mes), por lo tanto, es indispensable que las muestras recolectadas en este tipo de recipiente permanezcan a baja temperatura (refrigeración) y protegidas de la luz hasta su análisis.

5.1.2 Orden de muestreo

Las muestras para el sistema de carbonatos deben recolectarse inmediatamente después de recuperar el muestreador (e.g. botella Niskin) y antes de recolectar muestras para otros fines, para minimizar el intercambio gaseoso dentro del muestreador. El muestreador debe ser recuperado totalmente lleno y cerrado. En caso contrario, se recomienda repetir el muestreo. El orden recomendado para recolectar las muestras del sistema de carbonatos es: pH, C_T y A_T.

5.1.3 Filtración

Algunos análisis resultan afectados por la presencia de partículas en la muestra, pero filtrar la muestra también puede tener efectos perjudiciales en las mediciones de pH y C_T debido a los cambios de presión y la elevada turbulencia durante la filtración. Al muestrear en sistemas con baja productividad y pocos materiales en suspensión se puede omitir este proceso. Para muestras recolectadas en ambientes con alta productividad y abundante materia orgánica particulada se presentan dos posibilidades:

- a. Utilizar un sistema de filtración con bomba peristáltica acoplado a un filtro de membrana (Figura 2, Anexos), para remover fitoplancton y partículas de carbonato de calcio sin alterar el sistema de carbonatos de la muestra (Bockman & Dickson 2014).
- b. Muestras recolectadas en recipientes pequeños (viales 40 mL) se pueden filtrar manualmente con una jeringa de plástico (60 mL) y un filtro de fibra de vidrio GF/F de 0.7 μ m previamente secado en horno de mufla (480 °C x 8 h). Ver ensamblaje del sistema en Figura 3 (Anexos). Esta metodología no está validada, pero su efecto en el sistema de carbonatos de la muestra puede ser despreciable si se realiza con los siguientes cuidados:
 - ✓ Filtrar manteniendo un flujo de agua bajo y constante, para evitar turbulencia y la formación de burbujas durante el proceso (en la jeringa y las mangueras).
 - ✓ Formar una columna de agua entre la manguera final y la jeringa, para evitar el intercambio gaseoso.
 - ✓ Insertar la manguera hasta el fondo del vial y enjuagar 2-3 veces.
 - ✓ Dispensar la muestra despacio para evitar la formación de burbujas y extraer lentamente la manguera durante el proceso de llenado.

5.1.4 Preservación de muestras

Para prevenir la alteración del sistema de carbonatos por la actividad biológica, las muestras para

C_T y A_T se preservan con una solución saturada de $HgCl_2$. Agregar $HgCl_2$ (consultar volumen en sección 5.3.4) con pipeta o gotero previamente verificado, sin sumergir la punta de la pipeta o gotero en la muestra. Para muestras de pH no existe un método aceptado de preservación y deben medirse a la mayor brevedad posible después de la recolección (Dickson et al. 2007). El periodo de tiempo máximo recomendable ente la recolección y la medición es de 24 h, siempre y cuando las muestras se hayan filtrado y mantenido en condiciones de oscuridad y temperatura estable (usar como referencia la temperatura *in situ* durante la recolección). En casos excepcionales, las muestras de pH se pueden preservar con $HgCl_2$ (100 μ L en muestras de 250 mL) por un periodo de 10-20 días, siempre y cuando se corrija el valor del pH medido por la perturbación de la adición del $HgCl_2$ (Chou et al. 2016).

Si su país o laboratorio prohíbe usar $HgCl_2$ las muestras se deben filtrar, almacenar a temperatura <6 °C (NO congelar) y analizar a la mayor brevedad posible. El $ZnCl_2$ es menos tóxico y el Environmental Isotope Laboratory (University of Waterloo) recomienda utilizarlo para preservar muestras de agua para isótopos de carbono (agregar 2.5 mL de $ZnCl_2$ al 50% p/v para muestras de 250 mL). Este método de preservación no es común en la comunidad que trabaja con el sistema de carbonatos y no se recomienda su uso sin un procedimiento validado que garantice la veracidad de los resultados.

5.1.5 Espacio de aire

Con excepción de las muestras recolectadas para medir pH, en todas las botellas se debe dejar un espacio de aire equivalente al 1% del volumen de la botella (Dickson et al. 2007). Este porcentaje de volumen permite la expansión térmica de la muestra de agua y minimiza el intercambio gaseoso entre la misma y el espacio de aire. Si se utilizan botellas con tapa de rosca con sello hermético (Figura 1B) y se mantienen las muestras a baja temperatura (2 - 6 °C), no es necesario dejar el espacio de aire.

5.1.6 Estabilidad de las muestras en el tiempo

Los materiales certificados de referencia (CRM por sus siglas en inglés) filtrados con bomba peristáltica y preservados con $HgCl_2$ son estables por periodos >3 años para C_T y hasta diez años para A_T . El periodo de estabilidad también depende del recipiente para muestra utilizado. Los recipientes sugeridos para garantizar la estabilidad de la muestra a corto y largo plazo son:

- ✓ Largo plazo (>1 mes): botellas de borosilicato de cuello angosto con tapón esmerilado. Para sellar herméticamente el recipiente se debe aplicar grasa de silicón de alto vacío (e.g. Apiezon® L) al tapón esmerilado (Figura 4, Anexos) y girarlo ligeramente al insertarlo, para garantizar que todo el cuello de la botella esté recubierto de grasa y garantizar un sello hermético. Finalmente, asegurar el tapón con una banda elástica (Dickson et al. 2007).
- ✓ Corto plazo (<1 mes): botellas/viales de borosilicato con tapa de rosca con sello hermético. En el caso de los viales se deben utilizar tapas con septas de Teflón®, con lo cual se logra la estabilidad en C_T por al menos 148 días (Huang et al. 2012).

5.1.7 Limpieza de botellas y viales

Para evitar la contaminación de la muestra se debe eliminar todo residuo orgánico previo a la recolecta. Si se utiliza HCl durante la limpieza es importante garantizar que los recipientes no queden con residuos de ácido, para evitar cambios en el sistema de carbonatos.

- ✓ Botellas
Remover los residuos de grasa del cuello de la botella y del tapón esmerilado con papel

toalla o un hisopo húmedo, sin dejar restos de papel o algodón en la superficie. De ser necesario usar acetona y secar en un lugar ventilado, para que los restos del solvente se evaporen por completo. Seguidamente, limpiar la botella y el tapón con la opción a. o la opción b.:

- a. Lavado regular de cristalería y secado en horno de mufla (480 °C x 8 h).
 - b. Limpieza con una solución de HCl (10%), seguido por un enjuague exhaustivo con agua destilada/desionizada y secado en horno (60 °C x 15-24 h).
- ✓ Viales ámbar de borosilicato
- a. Lavado con HCl (10%),
 - b. Enjuague con abundante agua Milli Q o de la mejor calidad disponible para remover ácido,
 - c. Secado en horno de mufla (480 °C x 8 h).

5.2 Recolección de muestras: Con equipo muestreador

En la sección de anexos se incluye una lista de control, para verificar y repasar los procedimientos básicos de recolección, tratamiento y almacenamiento de muestras de agua.

5.2.1 Preparación de equipos y materiales

- a. Verificar equipos de medición in situ,
- b. Preparar el muestreador (e.g. botella de Niskin),
- c. Comprobar que los portafiltros contengan los filtros respectivos,
- d. Ajustar la micropipeta para dispensar el volumen de HgCl_2 requerido,
- e. Engrasar el tapón esmerilado de las botellas previo al muestreo. Untar cuatro líneas de grasa delgadas y equidistantes a lo largo de la superficie del tapón o una línea ondulada en la base (Figura 4), y evitar el exceso de grasa para no contaminar la muestra.

5.2.2 Recolectar la muestra con el muestreador

- a. Si no está bien cerrado o completamente lleno, se recomienda repetir el muestreo.
- b. Conectar la manguera de 40 cm (C_T : silicón; A_T/pH : Tygon®) a la válvula de purga del muestreador.
- c. Sumergir la manguera en agua limpia 24 h previo al muestreo contribuye a reducir la formación de burbujas.

5.2.3 Enjuagar (purgar) los recipientes para las muestras:

- a. Abrir la válvula del muestreador y dejar fluir el agua por varios segundos para evitar la formación de burbujas en la manguera. Si se forman burbujas persistentes pellizcar la manguera con los dedos para deshacerlas.
- b. Usar el agua que fluye para enjuagar 2-3 veces los recipientes (botellas/viales y jeringa de 60 mL si va a recolectar muestras de C_T en viales).

Nota 3. Si no cuenta con sonda multiparamétrica, recolectar la muestra para medir salinidad mientras enjuaga los recipientes para las muestras.

5.2.4 Recolectar las muestras para el sistema de carbonatos en el siguiente orden:

- ✓ **pH:** Insertar la manguera conectada al muestreador hasta el fondo de la botella, llenarla

evitando la formación de burbujas y dejar que rebose al menos 1.5 veces el periodo de tiempo que tarda en llenarse.

✓ **C_T en Botella:**

- Insertar la manguera conectada al muestreador hasta el fondo de la botella, llenarla evitando la formación de burbujas y dejar que rebose al menos 1.5 veces el periodo de tiempo que tarda en llenarse,
- Prensar (“pellizcar”) la manguera con los dedos y mantenerla así mientras se extrae lentamente de la botella, esto producirá el espacio de aire con el volumen requerido. Alternativamente, el espacio de aire también se puede lograr extrayendo un volumen definido de la muestra con la jeringa de 10 mL y la manguera de silicón de 10 cm.

✓ **C_T en Vial:**

- Conectar la jeringa a la manguera del muestreador y llenarla lentamente para evitar la formación de burbujas,
- Acoplar la jeringa al portafiltro y la manguera de silicón de 10 cm (ver esquema en Figura 3),
- Insertar la manguera hasta el fondo del vial y llenarlo lentamente para evitar la formación de burbujas,
- Extraer la manguera lentamente sin dejar espacio de aire.

✓ **A_T:**

- Insertar la manguera conectada al muestreador hasta el fondo de la botella, llenarla y dejar que rebose al menos 1.5 veces el periodo de tiempo que tarda en llenarse,
- Prensar (“pellizcar”) la manguera con los dedos y mantenerla así mientras se extrae lentamente de la botella, esto producirá el espacio de aire con el volumen requerido. Alternativamente, el espacio de aire también se puede lograr extrayendo un volumen definido de la muestra con la jeringa de 10 mL y la manguera de silicón de 10 cm.

5.2.5 *Agregar solución saturada de HgCl₂ sin sumergir la punta de la pipeta en la muestra (usar guantes de nitrilo).*

- ✓ Botellas 250 mL: adicionar 100 µL de HgCl₂.
- ✓ Viales 40 mL: adicionar 45 µL (1 gota con gotero) de HgCl₂.

5.2.6 *Cerrar el recipiente de la muestra e invertirlo suavemente varias veces, para diluir la solución de HgCl₂ de manera uniforme en toda la muestra (usar guantes de nitrilo).*

- ✓ Botellas con tapón esmerilado: secar el interior del cuello de la botella con papel toalla sin contaminar la muestra. Insertar el tapón engrasado y girarlo distribuyendo la grasa uniformemente (no deben formarse estrías ni burbujas) para un sellado hermético. Asegurar el tapón con una banda elástica (Figura 4, Anexos).
- ✓ Botellas/viales con tapa de rosca con sello hermético: sujetar el recipiente justo debajo del cuello con un papel toalla mientras coloca la tapa de rosca. El papel toalla absorberá los residuos de HgCl₂ que se desborden al cerrar la tapa.

5.2.7 *Medir temperatura y salinidad con una sonda multiparamétrica (a la misma profundidad de muestreo o con una muestra recolectada en otro recipiente).*

5.2.8 *Recolectar la muestra para nutrientes y filtrar a la mayor brevedad posible (revisar el protocolo de nutrientes de su laboratorio).*

5.2.9 *Colocar las muestras para el sistema de carbonatos y nutrientes en la hielera con hielo en posición vertical. Asegurar la refrigeración hasta el lugar de análisis.*

5.3 Recolección de muestras: Sin equipo muestreador – Botella en superficie

5.3.1 Preparación de equipos y materiales

- Verificar equipos de medición in situ,
- Manguera de 40 cm ó jeringa de 60 mL con manguera de silicón de 10 cm.
- Comprobar que los portafiltros contengan los filtros respectivos.
- Ajustar la micropipeta para dispensar el volumen de HgCl_2 requerido.

5.3.2 Enjuagar los recipientes para las muestras 2-3 veces antes de recolectar la muestra.

5.3.3 Recolectar las muestras para el sistema de carbonatos:

✓ Botella:

- Insertar la manguera hasta el fondo de la botella y cerrar el extremo libre de la manguera con el dedo pulgar.
- Sostener la botella boca abajo en posición vertical y colocar el extremo libre de la manguera a la misma altura formando una “U” (ver Figura 5, Anexos).
- Sumergir la botella en esta posición (no inclinar) a una profundidad de 30-50 cm y mantener el extremo libre de la manguera por encima de la superficie.
- Destapar lentamente el extremo libre de la manguera para llenar la botella y evitar la formación de burbujas.
- Luego de llenar la botella volver a cerrar el extremo libre de la manguera con el dedo pulgar, colocar la botella boca arriba y sacarla del agua.
- Con la botella fuera del agua retirar la manguera lentamente, el extremo cerrado con el pulgar producirá el espacio de aire con el volumen requerido.

✓ Vial:

- Recolectar la muestra a una profundidad de 30-50 cm con la jeringa de 60 mL, enjuagar 2-3 veces y llenar lentamente para evitar la formación de burbujas.
- Acoplar la jeringa al portafiltro y la manguera de silicón de 10 cm (ver esquema en Figura 3),
- Insertar la manguera hasta el fondo del vial, enjuagar 2-3 veces y llenarlo lentamente para evitar la formación de burbujas,
- Extraer la manguera lentamente sin dejar espacio de aire.

Nota 4. En las muestras para medir pH, NO debe quedar ningún espacio de aire.

5.3.4 Agregar solución saturada de HgCl_2 sin sumergir la punta de la pipeta en la muestra (usar guantes de nitrilo).

- ✓ Botellas 250 mL: adicionar 100 μL de HgCl_2 .
- ✓ Viales 40 mL: adicionar 45 μL (1 gota con gotero) de HgCl_2 .

5.3.5 Cerrar el recipiente de la muestra e invertirlo suavemente varias veces, para diluir la solución de HgCl_2 de manera uniforme en toda la muestra (usar guantes de nitrilo).

✓ Botellas con tapón esmerilado:

- secar el interior del cuello de la botella con papel toalla sin contaminar la muestra.
- Untar cuatro líneas de grasa delgadas y equidistantes a lo largo de la superficie del tapón o una línea ondulada en la base (Figura 4), y evitar el exceso de grasa para no contaminar la muestra.
- Insertar el tapón engrasado y girarlo distribuyendo la grasa uniformemente (no deben formarse estrías ni burbujas) para un sellado hermético.
- Asegurar el tapón con una banda elástica (Figura 4).

- ✓ Botellas/viales con tapa de rosca con sello hermético:
Sujetar el recipiente justo debajo del cuello con una toalla de papel mientras coloca la tapa de rosca. El papel toalla absorberá los residuos de HgCl_2 que se desborden al cerrar la tapa.
- 5.3.6 *Medir temperatura y salinidad con una sonda multiparamétrica (a la misma profundidad de muestreo).*
- 5.3.7 *Recolectar la muestra para nutrientes y filtrar a la mayor brevedad posible (revisar el protocolo de nutrientes de su laboratorio).*
- 5.3.8 *Colocar las muestras para el sistema de carbonatos y nutrientes en la hielera con hielo en posición vertical. Asegurar la refrigeración hasta el lugar de análisis.*
- 5.4 Recolección de muestras: Sin equipo muestreador - muestreo de fondo (buceo SCUBA)**
- 5.4.1 *Tener al alcance todos los materiales requeridos:*
 - ✓ Conectar la manguera de silicón de 10 cm a la jeringa de 10 mL.
 - ✓ Comprobar que los portafiltros contengan los filtros respectivos.
 - ✓ Ajustar la micropipeta para dispensar el volumen de HgCl_2 requerido.
- 5.4.2 *Recolectar las muestras para el sistema de carbonatos:*
 - ✓ Botella:
 - a. Sumergirla cerrada (tapón/tapa de rosca).
 - b. Cuando alcance la profundidad de muestreo abrirla lentamente para evitar la formación de burbujas, si se forman burbujas pequeñas puede agitar ligeramente para removerlas.
 - c. Cerrar la botella luego de verificar que no hay burbujas.
 - ✓ Vial:
 - a. Recolectar la muestra con la jeringa de 60 mL, enjuagar 2-3 veces y llenar lentamente para evitar la formación de burbujas.
 - b. En la superficie acoplar la jeringa al portafiltro y la manguera de silicón de 10 cm (ver esquema en Figura 3),
 - c. Insertar la manguera hasta el fondo del vial, enjuagar 2-3 veces y llenarlo lentamente para evitar la formación de burbujas,
 - d. Extraer la manguera lentamente sin dejar espacio de aire.
 - ✓ Recolectar la muestra para salinidad.
 - ✓ Recolectar la muestra para nutrientes y filtrar a la mayor brevedad posible (revisar el protocolo de nutrientes de su laboratorio).
- 5.4.3 *Ajustar espacio de aire:*
 - a. Usar jeringa de 10 mL con manguera de silicón de 10 cm.
 - b. En botellas con tapón esmerilado (250 mL) extraer 10 mL de muestra.
 - c. En botellas con tapa de rosca (250 mL) extraer 2-3 mL.
 - d. En las muestras para medir pH, NO debe quedar ningún espacio de aire.
- 5.4.4 *Agregar solución saturada de HgCl_2 sin sumergir la punta de la pipeta en la muestra (usar guantes de nitrilo).*

- ✓ Botellas 250 mL: adicionar 100 μ l de $HgCl_2$.
 - ✓ Viales 40 mL: adicionar 45 μ l (1 gota con gotero) de $HgCl_2$.
- 5.4.5 *Cerrar el recipiente de la muestra e invertirlo suavemente varias veces, para diluir la solución de $HgCl_2$ de manera uniforme en toda la muestra (usar guantes de nitrilo).*
- ✓ Botellas con tapón esmerilado:
 - a. secar el interior del cuello de la botella con papel toalla sin contaminar la muestra.
 - b. Untar cuatro líneas de grasa delgadas y equidistantes a lo largo de la superficie del tapón o una línea ondulada en la base (Figura 4), y evitar el exceso de grasa para no contaminar la muestra.
 - c. Insertar el tapón engrasado y girarlo distribuyendo la grasa uniformemente (no deben formarse estrías ni burbujas) para un sellado hermético.
 - d. Asegurar el tapón con una banda elástica (Figura 4).
 - ✓ Botellas/viales con tapa de rosca con sello hermético:
Sujetar el recipiente justo debajo del cuello con una toalla de papel mientras coloca la tapa de rosca. El papel toalla absorberá los residuos de $HgCl_2$ que se desborden al cerrar la tapa.
- 5.4.6 *Medir temperatura y salinidad con una sonda multiparamétrica (a la misma profundidad de muestreo o con una muestra recolectada en otro recipiente).*
- 5.4.7 *Recolectar la muestra para nutrientes y filtrar a la mayor brevedad posible (revisar el protocolo de nutrientes de su laboratorio).*
- 5.4.8 *Colocar las muestras para el sistema de carbonatos y nutrientes en la hielera con hielo. Asegurar la refrigeración hasta el lugar de análisis.*

5.5 Almacenamiento y documentación

- a. Muestras para el sistema de carbonatos (botellas de vidrio): almacenar en frío 4-6 °C (refrigerar, NO congelar) y en condiciones oscuras hasta su análisis.
- b. Muestras para nutrientes: luego de filtrar congelar y mantener en condiciones de oscuridad hasta su análisis.
- c. Muestras para salinidad: almacenar en lugar fresco y protegido de la luz hasta su análisis.
- d. Cada muestra debe tener la siguiente información:
 - ✓ Identificador único (código).
 - ✓ Fecha y hora de colecta.
 - ✓ Nombre la persona que realizó la recolecta.
 - ✓ Lugar de colecta: lo más preciso posible, preferiblemente indicar coordenadas de GPS.
 - ✓ Comentarios: cualquier dato adicional de interés (e.g. problemas durante la recolecta, condiciones de tiempo inusuales, etc).

En la sección de anexos se incluye la plantilla de una bitácora de campo para registrar la información de cada muestra recolectada.

6 DOCUMENTOS DE REFERENCIA

Bockman EE, Dickson AG. 2014. A seawater filtration method suitable for total dissolved inorganic carbon and pH analyses. *Limnology and Oceanography: Methods* 12: 191-195.

Chou WC, Gong GC, Yang CY, Chuang KY. 2016. A comparison between field and laboratory pH measurements for seawater on the East China Sea shelf. *Limnology and Oceanography: Methods* 14: 315-322.

Dickson AG, Sabine CL, Christian JR (Eds.). 2007. Guide to best practices for ocean CO₂ measurements. PICES Special Publication 3, 191 pp.

Dickson AG. 2016. Sampling and preservation of seawater for CO₂ analyses. 2nd Latin-American Course in Ocean Acidification, Ensenada, Mexico.

Huang W-J, Wang Y, Cai W-J. 2012. Assessment of sample storage technique for total alkalinity and dissolved inorganic carbon in seawater. *Limnology and Oceanography: Methods* 10: 711-717.

Intergovernmental Oceanographic Commission (of UNESCO). 2019. Indicator Methodology for 14.3.1, IOC/EC-LI/2 Annex 6 rev., 17 pp. (http://legacy.ioc-unesco.org/index.php?option=com_oe&task=viewDocumentRecord&docID=21938).

Pacific Marine Environmental Laboratory (PMEL). 2010. Inorganic carbon sampling: planning and sample collection. National Oceanic and Atmospheric Administration, Pacific Marine Environmental Laboratory, 8pp. (https://www.pmel.noaa.gov/co2/files/dic_sample_technique_revised_5-17-10.pdf).

Pimenta AR, Grear JS. 2018. EPA Guidelines for measuring changes in seawater pH and associated carbonate chemistry in coastal environments of the Eastern United States. Office of Research and Development, National Health and Environmental Effects Research Laboratory. EPA/600/R-17/483, 56 pp.

Woods Hole Oceanographic Institution (WHOI). 2014. Measuring ¹⁴C in seawater DIC by Accelerator Mass Spectrometry. WHP Operations and Methods, Woods Hole Oceanographic Institution, Massachusetts, 7pp. (<https://www.whoi.edu/files/server.do?id=75006&pt=2&p=75096>)

7 ANEXOS

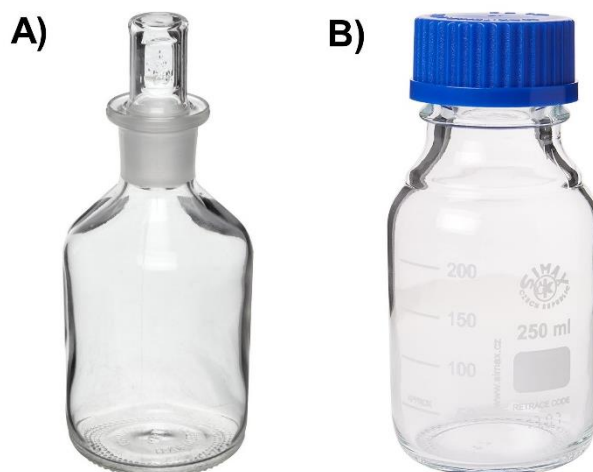


Figura 1. Botellas de vidrio para recolectar muestras de agua para el sistema de carbonatos. A) Botella de borosilicato con tapón esmerilado, sugerido por Dickson et al. (2007), B) botella de borosilicato con tapa de rosca de cierre hermético.



Figura 2. Esquema del sistema de filtración con bomba peristáltica acoplado a un filtro de membrana (Bockmon & Dickson 2014), para muestras recolectadas en ambientes con alta productividad y abundante materia orgánica particulada (imagen tomada de Dickson 2016).

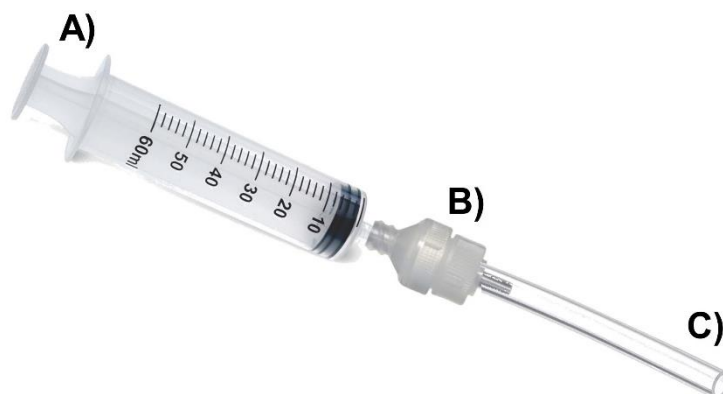


Figura 3. Sistema para filtración de muestras de C_T recolectadas en viales. Ensamblar las partes herméticamente, para evitar el intercambio gaseoso con la atmósfera A) jeringa 60 mL, B) portafiltro y filtro de microfibra de vidrio GF/F de $0.7 \mu\text{m}$, previamente secado en horno de mufla ($480 \text{ }^\circ\text{C} \times 8 \text{ h}$), C) manguera de silicón.

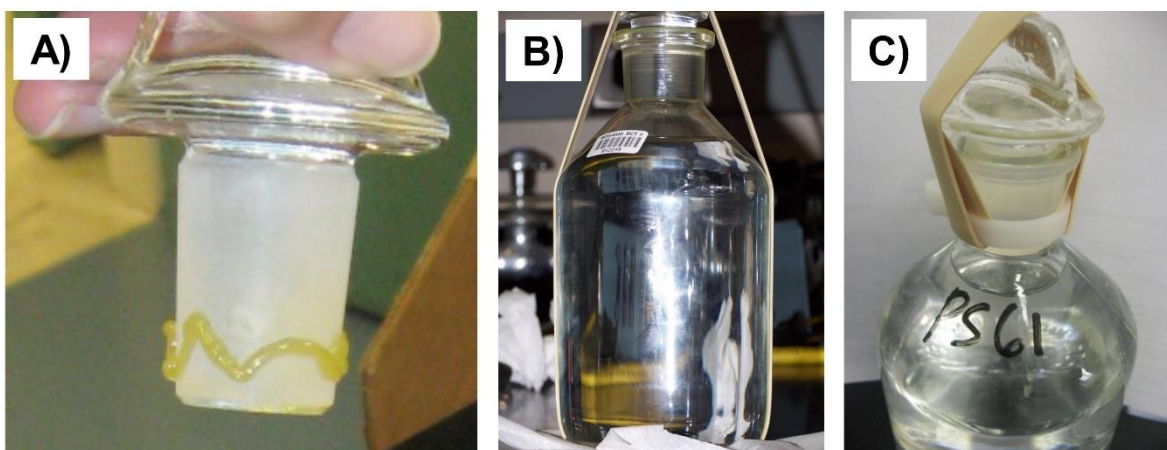


Figura 4. A) Tapón esmerilado con grasa de silicón de alto vacío (e.g. Apiezon® L). B-C) Tapón esmerilado asegurado con banda elástica (dos opciones). Imágenes tomadas de PMEL 2010 (A, C) y WHOI 2014 (B).



Figura 5. Esquema del sistema utilizado para muestreo superficial sin muestreador. Imagen capturada del video tutorial “GOA-ON in a Box: Collecting discrete samples for analysis” (https://www.youtube.com/watch?v=YF8sVW2_0Po&list=PLkDCbxtte-tKWKyKAJhvAQ9ZzyQli7wz&index=12&t=118s).