

**VERIFICACIÓN VIABILIDAD DE ORGANISMOS PLANCTÓNICOS EN AGUA DE LASTRE PARA EL
CUMPLIMIENTO DE LA REGULACIÓN D2**

FASE I: RESULTADOS PRELIMINARES



DIRECCIÓN GENERAL MARÍTIMA
CENTRO DE INVESTIGACIONES OCEANOGRÁFICAS E HIDROGRÁFICAS DEL CARIBE

ÁREA LABORATORIO- SEDE CARIBE
CARTAGENA DE INDIAS

2020



CONTENIDO

INTRODUCCIÓN	3
MARCO LEGAL.....	4
¿Qué dice la normativa?.....	4
MARCO CONCEPTUAL.....	5
El concepto de viabilidad	5
¿Cómo evaluar la viabilidad en el contexto regulatorio?	6
<i>Técnicas con tinciones</i>	7
<i>Otros métodos</i>	11
METODOLOGÍA.....	12
Equipamiento: El FlowCam	12
Ensayos y pruebas	14
<i>Fitoplancton</i>	14
<i>Zooplancton</i>	15
RESULTADOS PRELIMINARES	15
<i>Fitoplancton</i>	15
<i>Zooplancton</i>	22
CONCLUSIÓN.....	24
ACTIVIDADES PROYECTADAS PARA 2021.....	25
RECOMENDACIONES.....	25
REFERENCIAS	26



INTRODUCCIÓN

Las especies no nativas son organismos que establecen poblaciones fuera de su rango de distribución natural a través de vías de introducción intencionales o accidentales (Adams *et al.*, 2014). Las aguas de lastre constituyen un potente vector accidental de dispersión de especies acuáticas a nivel mundial y representan un gran riesgo para los ecosistemas.

Con el objetivo de reducir al máximo la transferencia de especies acuáticas invasivas, la Organización Marítima Internacional (OMI) ha generado dos directrices normativas para los países suscritos al convenio internacional para el control y la gestión del agua de lastre y los sedimentos de los Buques (Convenio BWM). Una de ellas implica la adecuación de sistemas de tratamiento a bordo de las embarcaciones y será exigida al entrar en vigor el convenio. No obstante, se ha demostrado que el uso de tecnologías modernas y la implementación de técnicas de tratamiento no garantiza una eficacia del 100%, ya que algunos organismos fotosintetizadores han sido capaces de crecer entre 4 y 20 días después de ser liberados en condiciones favorables (Kang *et al.*, 2010; Zetsche y Meysman, 2012; Austero, 2019).

Adicionalmente, la directriz D-2 de la OMI manifiesta la necesidad de realizar análisis indicativos y pormenorizados en los tanques de agua de lastre para verificar el funcionamiento de los sistemas de tratamiento. Los métodos tradicionales para la colecta, preservación y cuantificación del plancton asumen que los organismos intactos estaban vivos al momento de la colecta; sin embargo, este supuesto no es válido para muchos organismos en ambientes naturales y, posiblemente tampoco lo es para aguas de lastre (Adams *et al.*, 2014). En conformidad, la regulación de la OMI proporciona valores máximos de referencia para organismos viables, los cuales pueden llegar a representar entre el 27 y 100 % del total de organismos en la muestra (Adams *et al.*, 2014). La viabilidad de los organismos dependerá de factores como la longitud del viaje, las condiciones físico químicas, la realización de recambio en aguas oceánicas y la aplicación de algún sistema de tratamiento.

De acuerdo con lo anterior, verificar el cumplimiento de la regulación D-2 implica: 1) que los organismos necesitan ser contados y 2) que su viabilidad debe ser determinada (Zetsche y



Meysman, 2012). Adicionalmente, se deben cumplir criterios de robustez y baja variabilidad estadística (Carney *et al.*, 2013). puesto que al trabajar con bajas concentraciones de organismos el error envuelto en el procesamiento de las muestras puede representar la diferencia entre el cumplimiento o la sanción (Reavie *et al.*, 2010). Actualmente, no existe un protocolo único de evaluación de viabilidad que permita discriminar entre células u organismos funcionales y no funcionales.

Considerando que la viabilidad de las especies introducidas puede proveer información importante para categorizar los riesgos potenciales en puertos comerciales internacionales (Kang *et al.*, 2010), se hace urgente el desarrollo e implementación de procedimientos rigurosos, confiables y eficientes para la evaluación de la viabilidad de organismos en aguas de lastre (Reavie *et al.*, 2010). Sin embargo, debe tenerse claro que, ante la diversa composición taxonómica, distribución de tamaño y morfología de las comunidades planctónicas, la aspiración de un método de viabilidad de aplicación universal es algo poco realista (Zetsche y Meysman, 2012). En este documento se recopilan los fundamentos conceptuales y técnicos implicados en el proceso preliminar de validación de la técnica de viabilidad de organismos planctónicos desarrollada en el laboratorio sede Caribe de la DIMAR.

MARCO LEGAL

¿Qué dice la normativa?

Para permitir la descarga de aguas de lastre, la directriz D-2 de la OMI establece límites en la densidad de organismos viables. Para organismos cuya menor dimensión oscila entre 10 y < 50 μm deben registrarse < 10 organismos por ml. Si la dimensión mínima del organismo es $\geq 50 \mu\text{m}$, la densidad debe ser < de 10 organismos por m^3 (OMI, 2004).

La verificación del cumplimiento debe llevarse a cabo mediante la realización de dos tipos de análisis. En primera instancia, puede realizarse un análisis indicativo para examinar de manera superficial el cumplimiento. La idea es que el desarrollo de estos análisis ayude al estado rector del puerto a identificar medidas de mitigación inmediatas dentro de su alcance y se eviten impactos



adicionales por la descarga de aguas de lastre que no cumplen con los límites permitidos (Gollasch et al., 2015). En este caso, preferentemente las pruebas deben realizarse a bordo y arrojar resultados de manera rápida. Este análisis puede estar enfocado solamente en uno de los grupos definidos en el estándar D-2, ya que los resultados de solo un grupo de organismos pueden ser interpretados como una indicación clara del adecuado funcionamiento del sistema de manejo de aguas de lastre (Gollasch *et al.*, 2015).

Si los resultados del análisis indicativo señalan un posible incumplimiento, debe desarrollarse un análisis pormenorizado, el cual suele ser más complejo que un análisis indicativo. Las exigencias del muestreo y el análisis son mayores: las muestras colectadas deben ser representativas y contar con la calidad y cantidad suficiente para obtener una medición precisa de la concentración de organismos especificados en la norma D-2 para la categoría de tamaño que se está sometiendo a prueba. El número de organismos viables registrados debe extrapolarse al volumen total de agua filtrada y todos los resultados emitidos deben incluir el límite de confianza basado tanto en el error de muestreo como el error analítico (OMI, 2013).

Respecto a la evaluación de la viabilidad, la norma sugiere la observación de la actividad orgánica de los organismos y señala la posibilidad de emplear tinciones, pese a que muchas metodologías se encuentren en fase prueba. Adicionalmente se indica que los organismos plenamente intactos que no se muevan, pero muestren actividad orgánica deberían contarse como vivos.

MARCO CONCEPTUAL

El concepto de viabilidad

La guía G-8 de la OMI define a los organismos viables como organismos o cualquier estado de vida que está vivo (Steinberg *et al.*, 2012) sin brindar mayor información sobre la diferenciación entre los estados de vida y muerte. En un contexto microbiológico, la viabilidad se refiere a la capacidad de un organismo de crecer y reproducirse en condiciones apropiadas (Brussaard *et al.*, 2001); no obstante, a nivel pragmático esta acepción del concepto es difícil de evaluar debido a los ciclos de

vida y a la resistencia de los organismos. Por ejemplo, existe evidencia de células algales intactas y saludables que pasan a través del sistema digestivo de algunos zooplanctones permanecen viables (Fowler y Fisher, 1983).

Para grupos unicelulares, como el fitoplancton, la definición exacta de muerte celular no es clara. Típicamente la pérdida de integridad física de la membrana plasmática y la incapacidad de realizar transporte transmembranal son las principales características que distinguen a las células vivas de las muertas (Zetsche y Meysman, 2012). Para el caso del zooplancton, la aplicación del concepto es mucho más compleja dada su naturaleza pluricelular; en este sentido, se ha considerado la movilidad como criterio decisivo (Zetsche y Meysman, 2012).

¿Cómo evaluar la viabilidad en el contexto regulatorio?

Hasta la fecha, no existe un instrumento capaz de analizar la enorme variedad de especies contenida en las dos clases de tamaño referidas en la directriz D-2 sin requerir el criterio de un profesional experto para definir su estado de viabilidad (Gollasch *et al.*, 2015). No obstante, el hecho de que la muerte celular o la viabilidad no sean definidos con facilidad en términos de un único parámetro fisiológico o morfológico, constituye una ventaja para desarrollar múltiples aproximaciones (Brussaard *et al.*, 2001).

Para el fitoplancton (organismos con tamaño $\leq 50 \mu\text{m}$) se han registrado avances prometedores en la evaluación automática de la viabilidad usando herramientas como la citometría de flujo y los pulsos de amplitud modular. Determinar la viabilidad del fitoplancton a partir de observaciones microscópicas de muestras preservadas representa una tarea difícil, ya que los estadios de resistencias frecuentemente son ignorados (Kang *et al.*, 2010).

El estado de vitalidad de las células algales solía ser evaluado mediante la fluorescencia de la clorofila *a* en 685 nm; la ausencia de fluorescencia en esta longitud de onda era considerada un indicador de nula viabilidad (Zetsche y Meysman, 2012). Sin embargo, la permanencia de los cloroplastos y su fluorescencia roja en células muertas hace que se produzcan muchos falsos positivos (Reavie *et al.*, 2010), restando robustez al método (Zetsche y Meysman, 2012).

Para organismos con tamaño superior a $50 \mu\text{m}$, catalogados comúnmente como zooplancton, el progreso es menor (Kydd *et al.*, 2018). Para este grupo, la evaluación de la viabilidad debería basarse

en el movimiento de los organismos intactos, el cual puede ser estimulado mediante punción (OMI, 2013).

Sin importar el grupo de interés, con frecuencia diferentes estudios sobre un mismo método reportan resultados disímiles, lo cual indica que aún queda camino por recorrer hacia el entendimiento del comportamiento de la viabilidad en los ensamblajes naturales (Zetsche y Meysman, 2012).

Técnicas con tinciones

Un método alternativo para evaluar la viabilidad de los organismos está basado en las propiedades biofísicas de las células. Técnicas de tinciones vitales que penetran las células han sido desarrolladas para evaluar la viabilidad de organismos fito y zooplanctónicos en ambientes marinos y costeros (Adams *et al.*, 2014; De Castro *et al.*, 2018). En años recientes, el uso de SYTOX (Veldhuis *et al.*, 2001); diacetato de fluoresceína (FDA) (Peperzak y Brussaard, 2011); diacetato de fluoresceína + diacetato de 5-clorometilfluoresceína (Steinberg *et al.*, 2012) y rojo neutral (Zetsche y Meysman, 2012) ha sido probado. No obstante, la autofluorescencia roja de la clorofila ha representado inconvenientes, por ejemplo, al enmascarar la fluorescencia verde del FDA (Zetsche y Meysman, 2012). En este sentido, al no interferir con la fluorescencia roja de la clorofila, se ha sugerido el empleo de tinciones que fluorescen amarillo o verde bajo excitación con ciertas longitudes de onda (generalmente azules) (Brussaard *et al.*, 2001; De Castro *et al.*, 2018).

SYTOX: Tinción verde para ácido nucleico

La muerte celular es acompañada por una serie de procesos, entre los cuales se encuentra la pérdida de integridad de la membrana. Las tinciones más comunes para identificar células muertas son tinciones de ácidos nucleicos que permean la membrana de células no funcionales (Brussaard *et al.*, 2010).

El SYTOX emite una fluorescencia verde bajo excitación con láser de 488 nm (o una fuente de luz similar entre los 450-490 nm); la longitud óptima de excitación es de 504 nm y su pico de emisión es a 523 nm (Zetsche y Meysman, 2012). Esta tinción ha sido recomendada como indicador de



células muertas ya que penetra las células con membrana plasmática comprometida sin traspasar la membrana de las células vivas (Brussaard *et al.*, 2010). Los ácidos nucleicos, presentes en altas concentraciones en las células, tras unirse a un fluoróforo generan un aumento de la fluorescencia que puede ser detectado con facilidad (Brussaard *et al.*, 2010). Las células eucarióticas teñidas generalmente presentan un núcleo verde brillante como también un bajo nivel de tinción citoplasmática (Zetsche y Meysman, 2012).

SYTOX ha sido mayoritariamente empleado como un colorante de viabilidad para fitoplancton, con pocos experimentos en zooplancton. El estudio de Brussaard *et al.* (2010) mostró que las células muertas de *Micromonas pusilla* y *Phaeocystis pouchetii* se tiñen con mayor intensidad que las células vivas con membranas intactas. Por otro lado, los resultados de Zetsche y Meysman (2012) indican que la intensidad en la señal de fluorescencia de las células algales depende de la concentración de la tinción, por lo que este es un importante parámetro a considerar.

Para organismos con tamaño superior a 50 μm , al igual que para fitoplancton, los resultados dependen de la concentración de la tinción y del tiempo de la misma. Los patrones de tinción son irregulares con coloraciones diferenciales e inconsistencias entre replicas. Copépodos, poliquetos y nematodos emitieron fluorescencia verde después de teñirse con SYTOX; sin embargo, los niveles de fluorescencia en copépodos vivos y muertos teñidos con la misma concentración de reactivo (20 mM) fueron muy similares. Se presentaron dificultades para identificar si la fluorescencia proviene de las células de los organismos en si o corresponde a células de los contenidos estomacales o bacterias y pequeños microorganismos asociados. Por lo anterior, los resultados deben ser interpretados con cautela y este método se considera adecuado para la determinación de viabilidad de organismos zooplanctónicos (Zetsche y Meysman, 2012).

En el mercado se comercializa el kit de vivos y muertos # 1 (SYTO 10+DEAD RED; Molecular Probes), una combinación de tinciones fluorescentes independientes para vivos y muertos. El SYTOX 10 penetra las membranas celulares y se une al ADN, mientras que el DEAD RED se une solo al de las células muertas. Las células son catalogadas como muertas si su material nuclear fluoresce amarillo (una combinación de ambas tinciones) y como vivas, si solo expresa fluorescencia verde. Este kit ha sido usado en estudios con mamíferos, particularmente humanos, pero no ha sido probado en ensamblajes acuáticos microscópicos (Reavie *et al.*, 2010).



FDA–CMFDA (diacetato-5-fluoresceína, diacetato de clorometilfluoresceína)

El diacetato de fluoresceína (FDA) y el diacetato de clorometilfluoresceína (CMFDA) son tinciones vitales que se han utilizado para determinar la viabilidad. El FDA reacciona con actividad enzimática no específica dentro de las células, no es tóxica y es económica. El CMTFDA es ligeramente reactivo con el tiorbitol permitiendo que los componentes permanezcan más tiempo dentro de la célula; sin embargo, es más costosa (Adams *et al.*, 2014). Tanto el FDA como el CMTFDA colorean con verde fluorescente aquellas células con membrana celular intacta y producción de esterasas por actividad metabólica. Estas células son clasificadas como vivas, mientras que las células que no asimilan ninguno de los compuestos en su interior, son consideradas como no viables (Gollasch *et al.*, 2015).

Los resultados reportados en la literatura son variados, con unos autores indicando casos de éxito en cultivos de diatomeas de algunas especies, macroalgas marinas, dinoflagelados, protistas parásitos y bacterias marinas (Reavie *et al.*, 2010). Comparativamente, hasta el momento se evidencian tasas de falsos positivos significativamente más bajas para el fitoplancton respecto al zooplancton y los macroinvertebrados (Adams *et al.*, 2014).

Para el fitoplancton, las tinciones con FDA y CMTFDA usadas de manera independiente resultaron insuficientes para la evaluación de viabilidad. Brussaard *et al.* (2010) y Steinberg *et al.* (2012) atribuyen estos hallazgos a la tinción diferencial entre especies y la dependencia especie-específica de las señales de fluorescencia del FDA. Como alternativa, se propone la combinación de tinciones (FDA + CMTFDA) para la mayoría del fitoplancton (Steinberg *et al.* 2012).

En cuanto al zooplancton, los resultados son congruentes al considerar las tinciones vitales FDA y CMTFDA como métodos no adecuados para la evaluación de viabilidad en muestras de ensamblajes marinos. Las observaciones de Adams *et al.* (2014) refieren la tinción de zooplanctones y macroinvertebrados aún muchos días después de su muerte; la razón por la que esto sucede aún no ha sido aclarada. Particularmente, en muestras con presencia de grandes crustáceos como anfípodos y copépodos, una alta sobrestimación de los organismos puede observarse debido a la elevada fluorescencia de organismos muertos. De esta forma, la aplicación de FDA y FDA + CMTFDA en muestras que contienen estos ensamblajes debe ser desarrollada con cuidado (Adams *et al.*, 2014).



Pese a lo descrito anteriormente, la tinción con FDA parece constituir la mejor aproximación para determinar viabilidad (Reavie *et al.*, 2010). Sin embargo, son necesarios muchos más estudios antes de automatizar con éxito la determinación de la viabilidad de organismos (Zetsche y Meysman, 2012). Adicionalmente, el rápido oscurecimiento de la fluoresceína bajo luz azul persistente (Reavie *et al.*, 2010) es un factor que debe ser observado y manipulado en búsqueda de mejores resultados.

Rojo Neutral

El rojo neutral (clorhidrato de 3-amino-7-dimetilamino-2-metilfenazina) es una tinción débilmente catiónica, soluble en agua, que pasa a través de las membranas plasmáticas intactas y se concentra en los lisosomas de las células viables (Zetsche y Meysman, 2012). Actualmente, este colorante es usado para complementar el conteo manual y las determinaciones de viabilidad realizadas mediante movilidad de organismos.

La tinción con rojo neutral tiene resultados ambiguos para fitoplancton pequeño (e.g. Reynolds *et al.*, 1978). Sin embargo, en el estudio realizado por Zetsche y Meysman (2012), la tinción de algas vivas, tanto de cultivos como de ensamblajes naturales, fue exitosa tras aparecer en el citoplasma de células de diferentes tamaños (Zetsche y Meysman, 2012). Para zooplancton, Crippen y Perrier (1974) tiñeron exitosamente muestras no preservadas de plancton estuarino, las cuales incluían copépodos calanoides (adultos y nauplios), huevos y larvas de poliquetos, huevos de gastrópodos, larvas de hidrozooos, rotíferos y quetognatos. Del mismo modo, Zetsche y Meysman (2012) colorearon con éxito larvas de poliquetos, así como copépodos y sus nauplios. En contraste, Elliott y Tang (2009) tuvieron problemas con muestras preservadas de balanos (Tinción restringida a las articulaciones) y larvas de poliquetos (rápido oscurecimiento) y Zetsche y Meysman (2012) experimentaron dificultades con mysidos y larvas cypris, quienes exhibieron una tinción parcial. Los moluscos no siempre mostraron una absorción completa del rojo neutral en sus cuerpos (Zetsche y Meysman, 2012).

Pese a los resultados contradictorios para ciertos grupos, constituye un método prometedor por su bajo costo, facilidad de uso y amplia aplicabilidad para organismos con tamaño mayor a 50 μm (Zetsche y Meysman, 2012).

Otros métodos

Ensayos de digestión celular

Este método se fundamenta en la remoción selectiva de células muertas mediante enzimas digestivas. Las membranas de las células muertas o no funcionales son permeables a enzimas digestivas como las ADNasa I y la Tripsina. El ADN es fragmentado e hidrolizado por la ADNasa mientras que la Tripsina hidroliza los fosfolípidos de la membrana. El resultado final deseado es que las células se hacen indetectables a la observación microscópica, perdiendo cualquier señal de fluorescencia. Las células vivas, sin ser afectadas por la exposición a la mezcla de enzimas, retienen sus señales de fluorescencia. Debido a que este método opera en un nivel fisiológico básico podría, al menos en teoría, permitir una amplia aplicación en un diverso rango taxonómico de células planctónicas.

Para fitoplancton, Zetsche y Meysman (2012) encontraron que este método funciona mejor que la tinción con FDA, la cual solo funciona para seis de las nueve especies consideradas. En contraste, para el caso de los crustáceos, el exoesqueleto quitinoso forma una barrera para las enzimas y al parecer evita la digestión o desintegración de los organismos. En este sentido, por extrapolación los autores creen que no trabajará bien con organismos multicelulares de mayor tamaño. Las razones por las que las enzimas no digieren a algunos organismos permanecen desconocidas y son necesarios más estudios para poder garantizar la aplicabilidad de esta técnica.

Pulsos de amplitud modular (PAM)

Los instrumentos de PAM analizan la eficiencia fotoquímica del fotosistema II en el fitoplancton y el resultado es considerado como indicador de la condición de viabilidad de todo el fitoplancton de la muestra, sin considerar su tamaño. Este método ha sido catalogado como un método apropiado para el análisis de fitoplancton vivo y al parecer actualmente es la única herramienta indicativa para el análisis de muestras de aguas de lastre (Gollasch et al., 2015).



METODOLOGÍA

Equipamiento: El FlowCam

El FlowCam es un equipo que fusiona los componentes ópticos, electrónicos y de fluido para fotografiar, medir y contar de manera automatizada las partículas que pasan a través de una celda de vidrio (Sieracki *et al.*, 1998). El dispositivo puede capturar imágenes a tasas que superan las 20 imágenes por segundo (Modo Autoimagen) o puede activarse por la detección de una señal de fluorescencia de clorofila *a* mediante un láser (Modo Fluorescencia). En este último, si el aparato captura más de una partícula por imagen no puede determinar cuál de ellas emitió la señal de fluorescencia; adicionalmente este modo requiere la configuración de umbrales para diferentes parámetros (Romero-Martínez *et al.*, 2017). Es importante mencionar que, debido al flujo hidrodinámico de la muestra, la configuración del enfoque de las imágenes es un factor determinante para la correcta identificación de los organismos; imágenes de partículas u organismos desenfocados difícilmente pueden ser analizadas (Steinberg *et al.*, 2012).

Los sistemas que incorporan la citometría de flujo permiten obtener resultados de manera automática y rápida por lo que son útiles en la evaluación del número de organismos viables en una muestra después de su tratamiento con una tinción de viabilidad (OMI, 2013). Estos análisis tienen una alta precisión y buena reproducibilidad; además, permiten un estudio detallado de las células. Lo anterior representa una ventaja respecto a otros métodos indicativos (fluorescencia *in vivo*, tasas fotosintéticas) de escala poblacional y no celular (Brussaard *et al.*, 2001).

En particular, el Flowcam ha sido usado principalmente para analizar partículas menores a 200 μm (Kydd *et al.*, 2018) con mayor disponibilidad de información para fitoplancton. Si bien, el método es capaz de realizar conteos de partículas, el conteo de células en complejos coloniales y filamentos no es posible sin dedicar una cantidad considerable de tiempo en el análisis fotográfico (Reavie *et al.*, 2010).

Respecto a la cuantificación de organismos, estudios comparativos han demostrado que las herramientas automatizadas tienden a subestimar la concentración de partículas y se han observado diferencias entre los conteos realizados con el FlowCam y con microscopía tradicional. De manera general, para los grupos taxonómicos más abundantes de fitoplancton y zooplancton,



las estimaciones de concentración fueron aproximadamente 60 % más bajas en el Flowcam que en el microscopio (Kydd *et al.*, 2018).

De igual manera, existen evidencias de diferencias entre los dos métodos para la estimación de la medida de los organismos. Los organismos analizados en el microscopio tienden a caer de forma plana permitiendo que la longitud y el ancho sean medidos de manera precisa; en contraste, en el flowcam las partículas pasan a través de la cámara y el láser en cualquier ángulo, por lo que la longitud y el ancho pueden ser tomados en diversas orientaciones (Kydd *et al.*, 2018).

En trabajos exploratorios sobre la determinación de viabilidad, algunas investigaciones han combinado tinciones de viabilidad con citometría de flujo reportando afinidades especie-específicas para diferentes tinciones, por lo que la identificación del estado de viabilidad estaría restringida a la confiabilidad de la tinción (Reavie *et al.*, 2010). Considerando, las falencias reportadas para el método y la falta de información para zooplancton (Le Bourg *et al.*, 2015) y grupos heterótrofos de pequeño tamaño, es recomendable hacer verificaciones microscópicas para comprobar las lecturas automáticas.

El FlowCAM utilizado en este trabajo pertenece a la serie VS-4; está equipado con un láser azul de 488 nm, dos canales de filtros (Ch1 = 650 nm y Ch2 = 525 ± 15 nm) y Software Visual Spreadsheet versión 3.2.3. Adicionalmente cuenta con objetivos 4X, 10X y 20X, que tienen un rango de tamaño de partícula óptimo definido en fábrica, de 30–300 µm, 15–100 µm y 3–50 µm, respectivamente. Cada objetivo funciona con una celda de flujo y un colimador determinado (Tabla 1). La profundidad de la cámara de flujo establece el límite superior para el tamaño de las partículas que se pueden analizar, mientras que el límite inferior lo determina el tamaño más pequeño resuelto por el aumento.

La cámara digital tiene una resolución de 1024 X 768 píxeles. Para cada aumento, una constante de calibración de tamaño proporciona las dimensiones reales del campo de visión de la cámara (Manual FlowCAM, 2013). Para el modelo VS-4, el campo de visión que logra observarse a través de las celdas estandarizadas no es suficiente para cubrir todo el ancho de la cámara de flujo, a menos que se utilicen celdas especializadas Field of View (FOV).

Tabla 1. Especificaciones para las diferentes magnificaciones del equipo multipropósito Benchtop FlowCam

Objetivo	Jeringa de la bomba	Celda	Pretratamiento con	Soportes para
1X/2X	12.5 mL	FC4000, FC3000, FC2000x6, FC2000x4, FC1000FV,	NM-1000 (1000µm)	QCFC4000, QCFC3000, QCFC2000, QCFC1000, QCFC
4X	12.5 mL, 5 mL (predeterminada), 1 mL.	FC600, FC300 (predeterminada), FC300FV, FC200, FC100	NM-600 (600 µm), NM-300 (300µm), NM-100 (100µm)	QCFC600, QCFC300, QCFC FOV10, QCFC FOV5
10X	1 ml (predeterminada), 0.5 mL.	FC100 (predeterminada),	NM-100 (100µm)	QCFC300, QCFC FOV10, QCFC FOV5
20X	0.5 mL.	FC50	NM-50 (50µm), NM- 35 (35µm)	QCFC300

Ensayos y pruebas

Fitoplancton

Se colectaron un total de 10 muestras en el muelle del CIOH mediante arrastres verticales a 3 m con redes cónicas de 30 cm de diámetro de boca y tamaño de poro de 20 µm y 80 µm. Las muestras fueron almacenadas en botellas Nalgene con capacidad de 250 mL. En laboratorio todas las muestras fueron pos-filtradas mediante una malla de tamaño de poro de 22 µm y 43 µm, con el fin de evitar un posible taponamiento de la celda de flujo por saturación de partículas. Las muestras se mantuvieron frescas (sin preservar) y en condiciones de oscuridad para su posterior análisis en el FlowCam.

En la primera prueba, se evaluó el rendimiento de trabajo del modo autoimagen del FlowCam con aumentos de 4X, 10X y 20X, utilizando muestras naturales (sin fijar) colectadas mediante redes de 80 µm (4X) y 20 µm (10 y 20X). En la segunda prueba se realizaron barridos en el FlowCam con agua destilada con el fin de determinar el mínimo de partículas que puede contar el equipo. Finalmente, la tercera prueba tuvo como objetivo comprobar la eficiencia en la determinación de la viabilidad de organismos con el modo de fluorescencia para muestras sin preservar, muestras sin preservar con tinción de FDA y muestras preservadas sin tinción de FDA. Este último tratamiento empleó una muestra colectada en las Islas de Rosario y preservada con formaldehído al 36 % neutralizado con tetraborato de sodio.



Para aplicar el FDA fue necesario preparar una solución madre (Tsukiyama *et al.*, 1984; Lawrence *et al.*, 2006) con 0.1 mg de FDA diluidos en 100 ml de acetona para obtener una concentración final de 2.4 micromolar (mM). A cada muestra de 250 ml se le añadieron 0,5 mL de la solución madre de FDA alcanzando una concentración final de 4 nanomolar (nM) (Lawrence *et al.*, 2006).

Zooplankton

Para los análisis preliminares de este componente, se realizaron pruebas con muestras directas y de arrastres verticales. En el muelle del CIOH, se colectaron cinco muestras de forma directa y se realizaron cinco arrastres verticales a una profundidad de 3 m con una red cónica de 80 μm de ojo de malla. Las muestras fueron almacenadas en botellas nalgene de 2 L y 250 ml de capacidad, respectivamente.

En el laboratorio, cada muestra colectada de forma directa fue filtrada a través de una malla de 43 μm de poro por ser esta la más similar a la categoría de tamaño establecida en la D-2. El material retenido en el tamiz fue trasvasado a un vaso de precipitado y lavado con agua de mar filtrada. El mismo día de la colecta, cada muestra fue agitada ligeramente y una alícuota de 1 ml fue capturada para ser analizada en un microscopio invertido a un aumento de 20x. Los organismos observados fueron perturbados mediante punción para estimular el movimiento. Ante la elevada cantidad de organismos en movimiento, se adicionaron dos gotas de ácido acético (vinagre) para disminuir su actividad móvil. Para el caso de las muestras de arrastres verticales el análisis se realizó de la misma forma, omitiendo únicamente la filtración.

Todas las muestras fueron mantenidas bajo condiciones controladas de temperatura (entre 21 y 22 °C) y humedad (62 y 70%) durante 24 horas, para luego repetir los conteos en microscopio.

RESULTADOS PRELIMINARES

Fitoplancton

Primera prueba: Rendimiento de trabajo del equipo FlowCAM en el modo Autoimagen.

Antes de comenzar las pruebas, se configuraron filtros en el software VisualSpreadsheet. Para todos los objetivos empleados se aplicaron dos filtros: Diámetro ESD (Diámetro Esférico Equivalente) de partículas entre 10 y 50 μm ($10 \geq 50 \mu\text{m}$) y partículas entre 50 y 200 μm ($50 \geq 200 \mu\text{m}$).



Previa homogenización, de la muestra natural de 250 mL colectada mediante arrastre con red de 80 μm , se extrajeron 5 submuestras de 1 ml cada una. Este procedimiento de homogenización y extracción de alícuotas se realizó para trabajar con los objetivos de 4, 10 y 20 X. A partir de los cinco ensayos realizados con el objetivo de 4X, que abarca un rango de tamaño de partículas entre 30–300 μm , se determinó que 0.2 mL/min el caudal óptimo para la captura de imágenes. La limitación en la autoimagen hace referencia a la capacidad del software para discriminar partículas individuales en las fotografías (Sieracki *et al.*, 1998) mientras que para el sistema de fluid atañe al mantenimiento de la integración homogénea de las partículas en el fluido, evitando obstrucciones de la cámara de flujo o agregaciones. La limitación se establece por el hecho de que cada partícula dentro del rango de tamaño cubierto por cada combinación de lente / cámara de flujo es capaz de disparar la cámara, pero lo que se busca en dicha prueba es que la partícula que provoca el disparo esté presente en cada fotografía y con un buen enfoque. Si bien las pruebas realizadas con el equipo en modo autoimagen en un objetivo de 4X lograron el conteo de partículas con los rangos de tamaño establecidos en los filtros, las partículas menores a 100 μm , no tenían un enfoque adecuado al momento de ser fotografiadas (Fig. 1).



Figura 1. Fotografías de organismos fitoplanctónicos de una muestra natural, sin tinción FDA, analizada con objetivo 4X.

Con el objetivo de 10X (15–100 μm) empleado para muestra colectada con red de 20 μm , los resultados fueron positivos. El enfoque en este objetivo fue adecuado óptimo, obteniendo

fotografías claras de organismos fitoplanctónicos filtrados por las mallas y realizando el conteo de todas las partículas pasadas por la celda de flujo (Fig. 2).

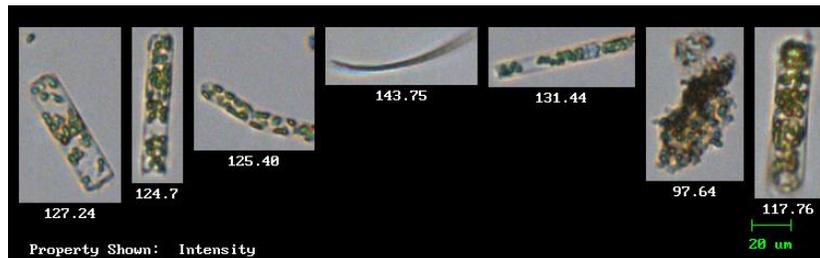


Figura 2. Fotografías de organismos fitoplanctónicos de una muestra natural sin tinción FDA, analizada con objetivo 10X.

Por último, con el objetivo de 20X (30–50 μm), nuevamente se trabajó con muestra obtenida con red de 20 μm . En este caso, no se pudo lograr un enfoque de las partículas. Además, al parecer el conteo no fue el adecuado, ya que al tomar la misma muestra pasada en el objetivo 10X y aplicando los mismos filtros, se obtuvieron cantidades diferentes a las reportadas en el ejercicio anterior para el filtro de partículas con tamaño entre 10 y 50 μm ($10 \geq 50 \mu\text{m}$) (Fig. 3).



Figura 3. Fotografías de organismos fitoplanctónicos de una muestra natural sin tinción FDA, analizados con objetivo 20X.

Segunda prueba: Barridos en FlowCAM en modo autoimagen de muestras de agua destilada para determinar el límite de cuantificación el equipo.

En la segunda prueba se procedió a realizar barridos con agua destilada para determinar el mínimo de partículas que puede contar y capturar el equipo FlowCAM. La decisión de trabajar con agua



destilada y no con agua de mar filtrada, se debe a que en pruebas anteriores se evidenció que el agua de mar, pese a ser filtrada, conserva una gran carga de materia orgánica particulada (Fig. 4). Cabe aclarar que, si bien el agua destilada también conserva algunas impurezas, la cantidad de partículas capturadas es inferior a la de agua de mar filtrada.

Para esta prueba se analizó una muestra de 1 ml con el objetivo de 10X, ya que fue el que generó mejores resultados en términos de enfoque en la primera prueba. Los resultados de esta prueba no fueron satisfactorios; el número de partículas reportadas por el equipo fue alto: en total contó 1419 partículas, de las cuales únicamente 54 partículas cumplieron con el filtro estipulado por el usuario.

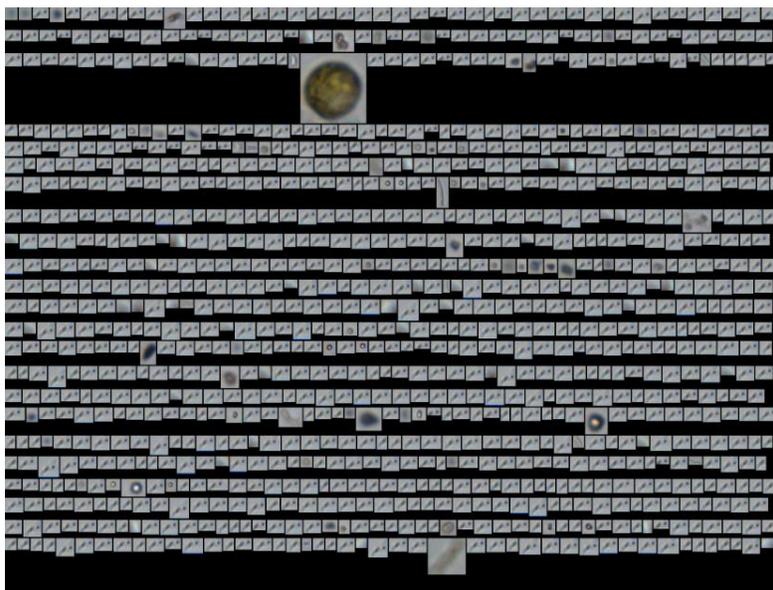


Figura 4. Partículas capturadas en el análisis de un blanco (agua de mar filtrada) analizado con el objetivo de 10X.

Los resultados obtenidos evidencian presencia de un alto número de partículas en la solución blanco (agua destilada). En los diferentes análisis realizados, se evidenció la presencia y captura de partículas (burbujas, imágenes de fondo dadas por la celda de flujo, imágenes repetidas y materia orgánica) (Fig. 5), que difieren de las partículas objetivo (organismos fitoplanctónicos y microzooplanctónicos). Lo anterior genera interferencias en el conteo de partículas y, en caso de que el fenómeno se presente en el modo fluorescencia, puede representar un error analítico en la detección de organismos viables. La presencia de estas partículas suele ser abundante y su



eliminación manual se convierte en una tarea dispendiosa, por lo que se recomienda crear filtros de tamaño o forma que permitan reducir al máximo el conteo de partículas no deseadas, en lugar de eliminarlas manualmente como se hace comúnmente (Álvarez *et al.*, 2012).

Tercera prueba: Eficiencia de detección de la viabilidad de organismos como modo fluorescencia.

El objetivo de esta prueba fue determinar la eficiencia del FlowCAM para detectar viabilidad de organismos por fluorescencia (Trigger), para esto se realizaron 5 réplicas por prueba. Las pruebas referidas en este apartado fueron realizadas con muestras naturales sin tinción, muestras sin preservar aplicando FDA y muestras preservadas con formaldehído y se asume que las partículas contadas emitieron fluorescencia.

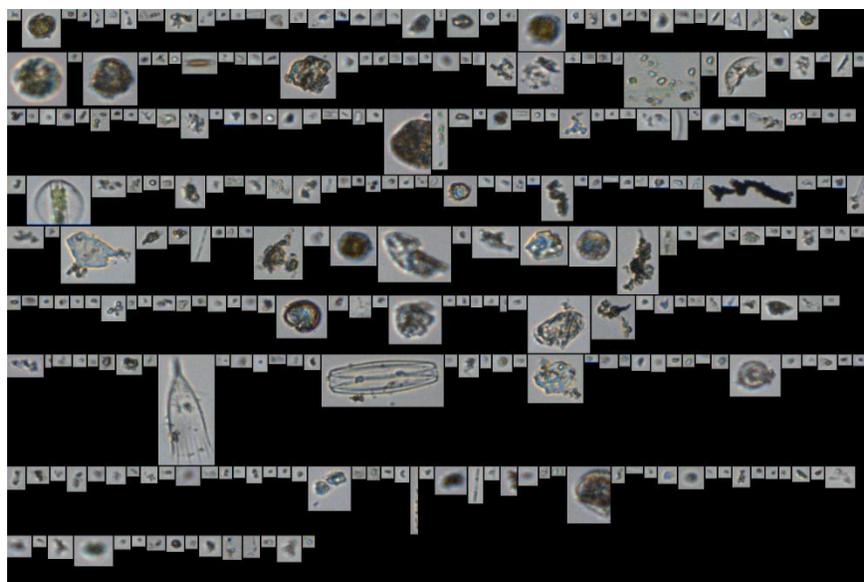


Figura 5. Partículas no deseadas (burbujas, imágenes de fondo dadas por la celda de flujo, imágenes repetidas y materia orgánica) que interfieren en la cuantificación de las partículas objetivo.

Muestras naturales sin tinción FDA

Los conteos arrojados por el FlowCam para los filtros establecidos en cada una de las réplicas son mostrados en la Tabla 2. En todos los casos el número de partículas con ESD entre 10-50 μm fue mayor; incluso, para las R4 y R5, representó el 100 % de las partículas detectadas, Además, el

número de partículas contadas presento un patrón de reducción desde la primera hasta la última replica analizada (Tabla 2).

Tabla 2. Conteos arrojados por el FlowCam para 5 réplicas de muestras naturales sin tinción de

Replica	Filtro	Conteo	Volumen %	Conteo %	Total partículas
R1	ESD 10-50µm	101	49,47	17,72	570
	ESD 50-200µm	7	45,85	1,23	
R2	ESD 10-50µm	73	39,95	10,14	720
	ESD 50-200µm	4	50,56	0,56	
R3	ESD 10-50µm	54	35,04	8,26	654
	ESD 50-200µm	2	43,94	0,31	
R4	ESD 10-50µm	38	39,67	5,3	717
	ESD 50-200µm	0	0	0	
R5	ESD 10-50µm	14	24,58	4,17	336
	ESD 50-200µm	0	0	0	

Muestras naturales con tinción de FDA

Para el caso de las muestras naturales con tinción de FDA se evidenció un incremento de conteos en todas las réplicas realizadas. Nuevamente el filtro de tamaño entre 10- 50 µm, obtuvo valores más altos. Para este caso no se observó ningún patrón de comportamiento entre replicas. (Tabla 3).

Tabla 3. Conteos arrojados por el FlowCam para 5 réplicas de muestras naturales con tinción de

Replica	Filtro	Conteo	Volumen %	Conteo %	Total partículas
R1	ESD 10-50µm	944	56	18,46	5113
	ESD 50-200µm	12	32,8	0,23	
R2	ESD 10-50µm	494	50,71	10,14	4871
	ESD 50-200µm	0	0	0	
R3	ESD 10-50µm	749	66,84	13,43	5579
	ESD 50-200µm	2	5,71	0,04	
R4	ESD 10-50µm	914	59,49	14,18	6444
	ESD 50-200µm	10	21,67	0,16	
R5	ESD 10-50µm	673	56,32	11,86	5676
	ESD 50-200µm	1	5,11	0,02	

Muestras preservadas con formaldehído y sin tinción con FDA



Para esta prueba se utilizó una muestra de agua colectada en Isla Cholón (Islas del Rosario) mediante arrastre horizontal con red de 30 cm de diámetro de boca y porosidad de 20 μm . La muestra fue tomada en el mes de octubre y procesada a finales del mes de noviembre, tiempo suficiente para eliminar cualquier posibilidad de presencia de organismos vivos. Los conteos obtenidos por el equipo son mostrados en la Tabla 4, donde se observa que el número de partículas contadas osciló entre 43 (R1) y 526 (R2). Al igual que en todas las demás pruebas, el número de partículas fue mayor para la clase de tamaño entre los 10 y 50 μm .

Tabla 4. Conteos arrojados por el FlowCam para 5 réplicas de muestras preservadas

Replica	Filtro	Conteo	Conteo %	Volumen %	Total
R1	ESD 10-50 μm	4	9,3	38,27	43
	ESD 50-200 μm	0	0	0	
R2	ESD 10-50 μm	170	32,32	75,81	526
	ESD 50-200 μm	4	0,76	21,28	
R3	ESD 10-50 μm	136	36,96	72,75	368
	ESD 50-200 μm	4	1,09	24,85	
R4	ESD 10-50 μm	95	35,98	72,78	264
	ESD 50-200 μm	2	0,76	24,47	
R5	ESD 10-50 μm	119	34	73,42	350
	ESD 50-200 μm	3	0,86	24,26	

Con relación al modo Trigger o modo fluorescencia se evidenció el reporte de partículas viables en las tres muestras empleadas. La detección de fluorescencia en la muestra preservada (Tabla 4) ratifica la baja robustez del método y el alto riesgo de generación de falsos positivos. La emisión de señal de fluorescencia se debe a que los cloroplastos de las células muertas pueden mantener su fluorescencia roja durante varias semanas después de morir (Reavie *et al.*, 2010). Los valores obtenidos en muestras naturales teñidas con FDA fueron mayores a 5000 partículas (Tabla 3). La observación de las fotografías permitió identificar una alta proporción de registros asociados a detritos o materia orgánica. La materia orgánica disuelta, debido a su naturaleza química, posee la propiedad óptica de absorber la luz en un amplio intervalo de longitudes de onda visibles y UV (Green y Blough, 1994). Entre el 40 y el 60 % de la materia orgánica natural es fluorescente y recibe el nombre de materia orgánica disuelta coloreada (CDOM) (Green y Blough, 1994) En este sentido, el análisis de muestras de agua en el FlowCam puede generar falsos positivos si no se utilizan los

reactivos adecuados y la configuración de filtros que solo tenga en cuenta organismos fitoplanctónicos.

Cabe resaltar que el valor umbral es un factor determinante para la implementación del método de fluorescencia, dado que la modificación de este tiene alta influencia en los resultados finales. Para la validación de este método, es necesario hallar el valor umbral adecuado para la determinación de los organismos viables. Los resultados de estas pruebas preliminares indican que la simple utilización de la señal de fluorescencia como indicador de viabilidad es errónea y que la eficiencia del FDA para discriminar entre células vivas y muertas es cuestionable. Por lo tanto, se deben realizar pruebas con mayor detalle antes de implementar este método como análisis indicativo o pormenorizado de cumplimiento de la normativa D-2. Se recomienda evaluar la combinación de reactivos que permitan teñir de manera diferencial células vivas y células muertas con el fin de generar datos de mayor confiabilidad. En este orden de ideas, se propone el uso del reactivo SYTOX como complemento del FDA, ya que esta tinción se ha utilizado predominantemente como colorante de no viabilidad para especies de fitoplancton (Veldhuis *et al.*, 2001). Adicionalmente, no se debe dejar de lado la posibilidad de explorar con otros métodos y equipos como los microscopios invertidos con sistema de fluorescencia reflejada (Ormachea y Villazón, 2017).

Zooplankton

En las muestras analizadas se encontraron organismos pertenecientes a grupos zooplanctónicos como Tintinnida, Mollusca, Copepoda y Polychaeta; los dos últimos presentaron estadios de desarrollo. En la Figura 6 se muestran los valores de densidad (Org /ml) obtenidos para cada una de las réplicas colectadas de forma directa. El panel a (Fig. 6a) corresponde a los conteos inmediatos y el b (Fig. 6b), a los conteos realizados después de 24 h.

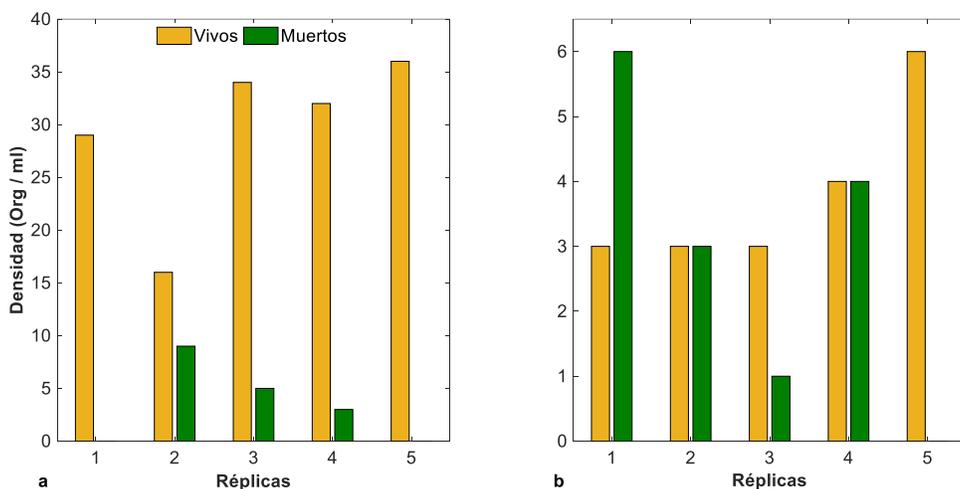


Figura 6. Densidad de organismos (Org/ ml) vivos y muertos registrada en muestras directas analizadas inmediatamente (a) y 24 h después de la colecta (b).

Como era de esperarse, los valores de densidad de organismos vivos descendieron y los de muertos aumentaron en los conteos realizados 24 horas después. Los conteos de las muestras colectadas mediante red, arrojaron valores de densidad mucho más altos asociados con el proceso de filtración (Fig. 7). Estos datos siguieron el mismo patrón de las densidades en muestras directas, con disminución en los conteos post 24 horas. Es importante notar que el número de organismos muertos fue muy bajo e incluso nulo. Se infiere que, debido a la concentración de organismos en un volumen pequeño, más alícuotas deben ser revisadas para estimar la tasa real de pérdida de organismos.

Es necesario realizar un seguimiento prolongado a las muestras sin preservar tanto directas como de red, para identificar el tiempo máximo de vida de los organismos bajo condiciones de laboratorio y ausencia de alimento. Conocer este parámetro será útil en la determinación del tiempo límite para realizar el análisis una vez las muestras sean colectadas.

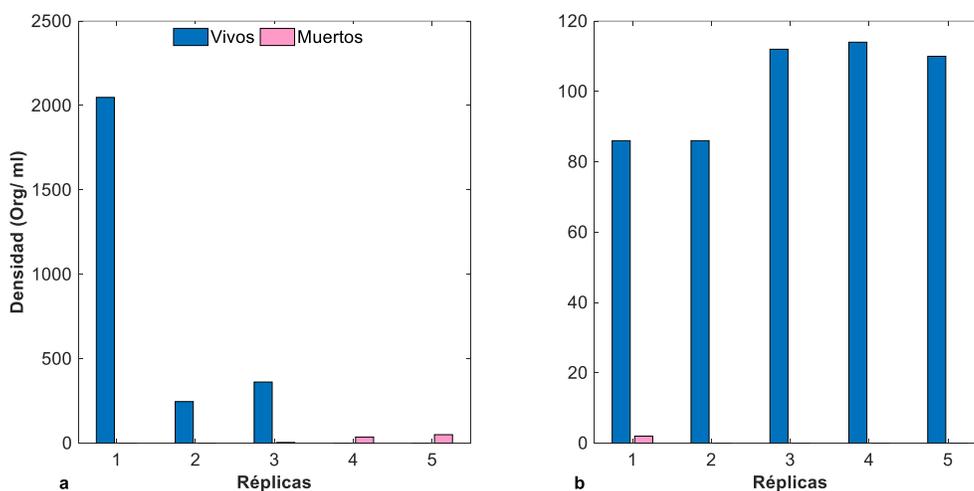


Figura 7. Densidad de organismos (Org/ ml) vivos y muertos registrada en muestras de arrastre analizadas inmediatamente (a) y 24 h después de la colecta (b).

Finalmente, se resalta la dificultad para detectar movimiento en algunos organismos como los tintínidos y los foraminíferos. En algunos casos la naturaleza de su lórica o testa impide observar la célula para detectar movimiento de los cilios o algún otro movimiento intracelular. Por lo anterior se recomienda complementar el criterio de movilidad con tinciones de viabilidad que han demostrado ser útiles para el zooplancton, como es el caso del rojo neutral.

CONCLUSIÓN

Las pruebas preliminares realizadas permitieron comprobar que las muestras en modo fluorescencia (bajo FlowCam) manifiestan un alto número de detecciones viables, registrando valores excesivos tanto en muestras preservadas, como en muestras naturales sin preservar, lo que hace cuestionable la selectividad del método. La revisión bibliográfica permitió concluir, además, que los cloroplastos de células después de morir pueden mantener su fluorescencia roja durante varias semanas, por lo que discriminar el estado de vida de las células de las algas por fluorescencia es un método aun cuestionable. Dado lo anterior, se recomienda la combinación de reactivos que permitan teñir organismos vivos (FDA) y muertos (SYTOX's), con el fin de generar mayor confiabilidad al momento de reportar partículas vivas. Cabe resaltar que existen otros métodos y

equipos confiables que permiten determinar la viabilidad de organismos, tales como los microscopios invertidos con sistema de fluorescencia Reflejada.

Con respecto a organismos zooplanctónicos en las pruebas de motilidad realizadas, se evidenció la dificultad para detectar movimiento en algunos organismos como los tintínidos y los foraminíferos, ya que estructuras como la lóricas o testa impidieron observar la célula para detectar movimiento de los cilios o algún otro movimiento intracelular, por lo que se recomienda complementar el criterio de movilidad con tinciones de viabilidad que han demostrado mediante estudios ser útiles para el zooplancton, como es el caso del rojo neutral.

RECOMENDACIONES

Se recomienda como parte de la fase II de la verificación viabilidad de organismos planctónicos en agua de lastre para el cumplimiento de la regulación D2 el desarrollo de las siguientes actividades con el fin de culminar satisfactoriamente la comprobación del método.

ACTIVIDADES PROYECTADAS PARA 2021

Durante el 2021 se tiene proyectada la realización de pruebas adicionales incluyendo parámetros no considerados hasta ahora. La realización de estas actividades está sujeta a la adquisición de reactivos y adecuación de equipos necesarios para su cumplimiento. La Tabla 5 resume las actividades propuestas para plancton, su objetivo y metodología de desarrollo.

Tabla 5. Propuesta de actividades a desarrollar durante 2021 para el componente planctónico

Actividad	Objetivo	Metodología
Estimación de tiempo límite de vida	Determinar el tiempo máximo que permanecen viables los organismos en condiciones de laboratorio para establecer el tiempo máximo que puede soportar una muestra sin ser analizada.	Revisión de muestras diariamente para establecer la disminución en la viabilidad de organismos.
Estimación de respuestas a punción (zooplancton)	Determinar si la perturbación por punción es confiable al momento de considerar a un	Monitorear la respuesta de diferentes organismos a la respuesta por punción.



	organismo como vivo o muerto para detectar posibles falsos negativos.	
Tinción con rojo neutral para zooplancton y FDA y SYTOX's para fitoplancton en muestras naturales y preservadas	Evaluar la eficacia de esta tinción en muestras vivas y muertas preservadas de aguas de lastre y ensamblajes naturales y detectar posibles diferencias en los conteos de células viables por efecto de la fijación.	Análisis de muestras y cuantificación con microscopía para el caso del zooplancton y citometría de flujo para fitoplancton.
Establecimiento de concentración y tiempo de tinción	Establecer la concentración de la tinción y el tiempo de reposo óptimos para obtener resultados confiables.	Realización de pruebas con diferentes combinaciones de concentración de tinción y tiempo de reposo.

Por otra parte, es necesario realizar mantenimiento correctivo del equipo FlowCAM, ya que, aunque se encuentra operativo, presenta algunas novedades en el movimiento de micrómetro por oxidación, oxidación en bomba peristáltica y en ocasiones en modo fluorescencia. De igual manera durante la operación del equipo se evidenció fallas en el funcionamiento del software.

REFERENCIAS

- Adams, J. K. *et al.* (2014) Evaluating the response of freshwater organisms to vital staining. *Manag. Biol. Invasions*, 5, 197–208.
- Álvarez, E. (2014) Estructura y fisiología de la comunidad planctónica a partir de métodos de digitalización y análisis de imagen. Tesis doctoral. Universidad de Oviedo. 139 p.
- Austero, N. M. (2019) Viability of Phytoplankton from Ballast Waters of International Vessels Berthing at Ports of Cebu and Subic Bay, Philippines. *Sci. Diliman*, 31, 69–78.
- Brussaard, C. P. D. *et al.* (2001) Flow cytometric analysis of phytoplankton viability following viral infection. *Aquat. Microb. Ecol.*, 26, 157–166.
- Carney, K. J. *et al.* (2013) Difficulties in obtaining representative samples for compliance with the Ballast Water Management Convention. *Mar. Pollut. Bull.*, 68, 99–105.
- Crippen, R. W. y Perrier, J. L (1974) The use of neutral red and Evans blue for live-dead



determinations of marine plankton (with comments on the use of rotenone for inhibition of grazing). *Biotech. Histochem.*, 49, 97–104.

De Castro, M. C. *et al.* (2018) Different approaches and limitations for testing phytoplankton viability in natural assemblies and treated ballast water. *Mar. Pollut. Bull.*, 137, 172–179.

Elliott, D. T y Tang, K. W (2009) Simple staining method for differentiating live and dead marine zooplankton in field samples. *Limnology and Oceanography: Methods* 7, 585– 594, <http://dx.doi.org/10.4319/lom.2009.7.585>

Fluid Imaging Technologies (2013) FlowCam Manual. Fluid Imaging Technologies Inc.

Gollasch, S. *et al.* (2015) Quantifying indicatively living phytoplankton cells in ballast water samples - recommendations for Port State Control. *Mar. Pollut. Bull.*, 101, 768–775.

Green, S. y Blough, N. (1994). Optical absorption and fluorescence properties of chromophoric dissolved organic matter in natural waters. *Limnol Oceanogr*, 39, 1903-1916.

Kang, J. H. *et al.* (2010) Phytoplankton viability in ballast water from international commercial ships berthed at ports in Korea. *Mar. Pollut. Bull.*, 60, 230–237.

Kydd, J. *et al.* (2018) Examination of a high resolution laser optical plankton counter and FlowCAM for measuring plankton concentration and size. *J. Sea Res.*, 133, 2–10.

Le Bourg, B., *et al.* (2015) FlowCAM as a tool for studying small (80–1000 μm) metazooplankton communities. *J. Plankton Res.* 37 (4), 666–670. <http://dx.doi.org/10.1093/plankt/fbv025>.

OMI (2004) Convención para el Control y Manejo del Agua de Lastre y Sedimentos. Adoptada el 13 Febrero de 2004.

OMI (2013). BWM.2/ Circ. 42. Orientaciones sobre el muestreo y el análisis del agua de lastre para su utilización con carácter experimental de conformidad con lo dispuesto en el Convenio BWM y en las Directrices (D2).

Ormachea, O. y Villazón, A. 2017. Desarrollo de un microscopio de epifluorescencia de bajo costo. *Investigación & Desarrollo* 1 (17), 5-14.

Peperzak, L. y Brussaard, C. P. (2010) Phytoplankton viability assay for oil compounds in water. In: Timmis, K. N. (ed.) Handbook of hydrocarbon and lipid microbiology. Springer, Berlin Heidelberg, pp. 4499–4508.

Poulton, N. y Martin, J. (2010) Imaging flow cytometry for quantitative phytoplankton analysis – FlowCAM. En: Karlson, B., Cusack, C. and Bresnan, E. (eds). Microscopic and molecular methods for quantitative phytoplankton analysis. Paris, France: UNESCO.

Reavie, E. D. *et al.* (2010) Assessing ballast water treatments: Evaluation of viability methods for ambient freshwater microplankton assemblages. *J. Great Lakes Res.*, 36, 540–547.

Romero-Martínez, L. *et al.* (2017) Assessment of imaging-in-flow system (FlowCAM) for systematic ballast water management. *Sci. Total Environ.*, 603–604, 550–561.



la seguridad
es de todos

Mindefensa



Dirección General Marítima

Autoridad Marítima Colombiana

Centro de Investigaciones Oceanográficas
e Hidrográficas del Caribe

- Sieracki, C.K., *et al.* (1998) An imaging-in-flow system for automated analysis of marine microplankton. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 168:285–296. <http://dx.doi.org/10.3354/meps168285>.
- Steinberg, M. K. *et al.* (2012) Comparison of techniques used to count single-celled viable phytoplankton. *J. Appl. Phycol.*, 24, 751–758.
- Veldhuis, M. J. W., *et al.* (2001) Cell death in phytoplankton: correlation between changes in membrane permeability, photosynthetic activity, pigmentation and growth. *Eur. J. Phycol.*, 36, 167–177.
- Zetsche, E. M. y Meysman, F. J. R. (2012) Dead or alive? Viability assessment of micro- and mesoplankton. *J. Plankton Res.*, 34, 493–509.