

VALIDACIÓN DEL MÉTODO CITOMETRÍA DE FLUJO PARA LA DETERMINACIÓN DE VIABILIDAD DE ORGANISMOS FITOPLANCTÓNICOS EN AGUAS DE LASTRE Y AGUAS MARINAS Y/O ESTUARINAS – FASE II



PD8. LISETH JOHANA ARREGOCÉS
Bióloga Marina.
Responsable Laboratorio de Biología

Contenidos:

CPS. LUIS DE LA HOZ BARRIENTOS
Biólogo.

CPS. DANIELA ROJAS SÁNCHEZ
Bióloga.

**ÁREA DE PROTECCIÓN DEL MEDIO MARINO
CARTAGENA, COLOMBIA
DICIEMBRE, 2021.**

En este documento se recopilan los avances metodológicos y fundamentos técnicos implicados en el proceso de validación de la técnica de viabilidad de organismos planctónicos desarrollada en el laboratorio sede Caribe de la DIMAR.

Tabla de Contenido

INTRODUCCIÓN	4
METODOLOGÍA.....	5
<i>EQUIPAMIENTO: FLOWCAM</i>	5
<i>EQUIPOS, INSTRUMENTOS Y MATERIALES EMPLEADOS</i>	6
<i>REACTIVOS Y MATERIAL DE REFERENCIA (PATRONES, MR Y MRC)</i>	8
<i>CONTEXTO</i>	8
RESULTADOS: ENSAYOS Y PRUEBAS	9
1. LÍMITES DE DETECCIÓN (LD) Y CUANTIFICACIÓN (LC)	9
2. PRUEBA DE FLUORESCENCIA EN MUESTRA NATURAL PROVENIENTE DE UN ECOSISTEMA EUTRÓFICO.	11
CONCLUSIONES.....	13
RECOMENDACIONES	14
REFERENCIAS	15

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).

El presente documento se encuentra enmarcado en el proyecto “Producir información técnica-científica para PMM en Áreas Marinas y Zonas Portuarias” y los ensayos realizados para la

verificación del método se ajustan a los requerimientos establecidos en los procedimientos del sistema de Gestión de calidad del laboratorio de la Dirección General Marítima. Teniendo en cuenta lo anterior, los resultados de la validación del método se encuentran consignados en el formato *M5-00-FOR-065 INFORME DE SELECCIÓN VALIDACIÓN O VERIFICACIÓN DE MÉTODO DE ENSAYO* (Anexo 1) y a continuación se presenta se amplía del procedimiento y análisis de los resultados obtenidos.

METODOLOGÍA

EQUIPAMIENTO: 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 Tela Nitex	Soportes para Celdas de flujo
1X/2X	12.5 mL	FC4000, FC3000, FC2000x6, FC2000x4, FC1000FV,	NM-1000 (1000µm)	QCFC4000, QCFC3000, QCFC2000, QCFC1000, QCFC FOV10
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), FC80FV, FC80-7FV, FC90FV	NM-100 (100µm)	QCFC300, QCFC FOV10, QCFC FOV5
20X	0.5 mL.	FC50	NM-50 (50µm), NM-35 (35µm)	QCFC300

EQUIPOS, INSTRUMENTOS Y MATERIALES EMPLEADOS

En la tabla 2 se describen los equipos, materiales e instrumentos empleados en la validación del método para la determinación de viabilidad de organismos fitoplanctónicos a través de la técnica de citometría de flujo usado en aguas de lastre en el laboratorio del CIOH.

Tabla 2. Equipos, instrumentos y materiales empleados en la validación del método para la determinación de viabilidad de organismos fitoplanctónicos a través de la técnica de citometría de flujo.

Nombre	Fabricante	Modelo	Certificado de Calibración y/o Calificación		Incertidumbre
			Fecha	Número	
FlowCAM	Fluid Imaging Technologies	VS-4	S/C	S/N	S/C
Nevera	Panasonic	MPR-414F-PA	7/04/2021	MI-13190	±2.2°C
Congelador	Panasonic	MPR-414F-PA	7/04/2021	MI-13190	±2.3°C
Mallas 10 µm	Fluid Imaging Technologies	N/A	N/A	N/A	N/A
Mallas 50 µm	Fluid Imaging Technologies	N/A	N/A	N/A	N/A
Red plancton 20 µm	Biologika	N/A	N/A	N/A	N/A
Botella Niskin	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
Recipientes Nalgene ambar 250 mL	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
Recipientes Nalgene ambar 500 mL	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
Embudo de plástico	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
Nevera tipo igloo	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
Balón					
aforado 100 mL Cl A	BRAND	DURAN	9/11/2012	37260	±0.0118 mL
Pipeta graduada 1 mL	BRAND	DURAN	N/A	N/A	0.01 mL
Probeta de 500 mL Clase A	SCHOTT	DURAN	N/A	N/A	±5 mL
Matraz kitasato	SCHOTT	DURAN	N/A	N/A	N/A
Pinzas planas con punta	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
Filtros de fibra de vidrio GF/F 47mm	GE Healthcare	Whatman	N/A	N/A	N/A
Embudo de filtración	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
Peras de succión	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
Beaker de 100 mL clase A	SCHOTT	DURAN	N/A	N/A	N/A
Beaker de 500 mL clase A	SCHOTT	DURAN	N/A	N/A	N/A
Celda de flujo de 100 um x 2 mm	Fluid Imaging Technologies	FC100X2	N/A	N/A	N/A
Celda de flujo de 300 um	Fluid Imaging Technologies	FC300FV5	N/A	N/A	N/A
Celda de flujo de 80 um	Fluid Imaging Technologies	FC80FV	N/A	N/A	N/A

Celda de flujo de 50 um	Fluid Imaging Technologies	FC50	N/A	N/A	N/A
Celda de flujo de 100 um x 1 mm	Fluid Imaging Technologies	FC100X1	N/A	N/A	N/A

REACTIVOS Y MATERIAL DE REFERENCIA (PATRONES, MR Y MRC)

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). Autores (Brussaard *et al.*, 2001; De Castro *et al.*, 2018), han sugerido el empleo de tinciones que fluorescen amarillo o verde bajo excitación con ciertas longitudes de onda (generalmente azules). Para la técnica aplicada en el presente estudio se utilizó el reactivo FDA (Diacetato de fluoresceína), el cual reacciona con actividad enzimática no específica dentro de las células, no es tóxica y es económica (tabla 3).

Tabla 3. Reactivo para la tinción para citometría de flujo empleado en la validación del método para la determinación de viabilidad de organismos fitoplanctónicos.

Nombre	Referencia	Lote	Fecha venc.	Concentración	Pureza	Incertidumbre
Fluorescein Diacetate (FDA)	INVITROGEN	2333068	nov-22	5mg/ml	N/A	N/A

El reactivo FDA colorea 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).

CONTEXTO

La validación del método para la determinación de viabilidad de organismos fitoplanctónicos a través de la técnica de citometría de flujo usado en aguas de lastre en el laboratorio del CIOH, fue realizado en el área Biología involucrando principalmente la zona 8.

Se abordaron tres tipos de matrices: 1) Agua de Mar Sintética, Agua de Mar Natural y 3) Solución Madre (FDA) preparada en acetona grado analítico. La primera fue usada para blancos con el fin de determinar el Límite de Detección y Límite de Cuantificación, mientras que las dos últimas fueron utilizadas para realizar prueba de fluorescencia en muestras naturales provenientes de un ecosistema eutrófico.

Para evaluar los diferentes parámetros analíticos se trabajaron cinco (05) replicas, abordadas por dos analistas, en días diferentes. A continuación, se relaciona la identificación de siglas empleadas en el ejercicio de verificación; así:

A1 = Analista 1 (Luis Alberto De La Hoz Barrientos)

A2 = Analista 2 (Daniela Yomaira Rojas Sánchez)

BCO = Blanco

BFLO = Blanco fortificado laboratorio (Oligotrófico)
BFLE = Blanco fortificado laboratorio (Eutrófico)
MALCS = Muestra agua de lastre de buque con sistema de tratamiento sin FDA
MALCSFDA = Muestra agua de lastre de buque con sistema de tratamiento con FDA
MNOCFDA = Muestra natural oligotrófica con FDA
MNOSFDA = Muestra natural oligotrófica sin FDA
MNECFDA = Muestra natural eutrófica con FDA
MNESFDA = Muestra natural eutrófica sin FDA
MNF = Muestra natural fijada

Cabe resaltar que, la realización de los ensayos requiere la preparación de ciertas soluciones de trabajo las cuales se utilizarán en la determinación del analito. A continuación, se describe la preparación de las soluciones de trabajo con base a las notas técnicas reportadas por Fluid Imaging Technologies (2006), y a los autores Tsukiyama *et al.* (1984), Poulton y Martin (2010) y Lee *et al.* (2015):

Solución stock estándar de FDA (SSE): transferir la totalidad del contenido de la ampolla del material de referencia de 1 gr de diacetato de fluoresceína (FDA) en un balón volumétrico de 200 mL, y agregar acetona hasta aforar, cubrir con papel de aluminio para proteger de la luz. Almacenar a temperatura aproximada o igual a -20 °C. la concentración de la solución sería de 5mg/ml

Solución MN-FDA: Adicionar 45 µl de SSE en 1 ml de una muestra natural e incubar entre 25 y 29°C durante 10 minutos.

Agua de mar sintética: Disolver 25 g de cloruro de sodio (NaCl) y 8 g de sulfato de magnesio heptahidratado (MgSO₄*7H₂O) en agua desionizada y aforar en un balón de 1000 mL.

RESULTADOS: ENSAYOS Y PRUEBAS

A continuación, se describen los parámetros evaluados en la presente validación del método, adicionalmente, se incluye el valor obtenido.

1. LÍMITES DE DETECCIÓN (LD) Y CUANTIFICACIÓN (LC)

Límite de Detección: Cantidad más pequeña de mensurando en una muestra que puede ser detectada por una única medición, con un nivel de confianza determinado, pero no necesariamente cuantificada con un valor exacto. Es expresado como concentración del mensurando. Se calcula sumando la señal media del blanco más un múltiplo K (K se fija normalmente en tres (3) veces la desviación estándar de la señal de blancos.

Límite de Cuantificación: Cantidad más pequeña del mensurando en una muestra que puede ser cuantitativamente determinada con la precisión, exactitud, selectividad y linealidad del método. Se calcula sumando la señal media del blanco más un múltiplo K (K se fija normalmente en diez (10) veces la desviación estándar de la señal de blancos.

Para evaluar este parámetro se utilizaron blancos (BCO), a los cuales se les aplicó la misma cantidad de FDA que a una muestra (45 µl en 1 ml de muestra), estos blancos consisten en agua de mar sintética.

El límite de detección y el límite de cuantificación se obtienen leyendo la fluorescencia de cinco (05) BCO analizados en tres (03) días diferentes, por dos analistas (A1 y A2) (Tabla 1). Para el límite de detección, se calcula el promedio y la desviación estándar del conjunto de datos y se multiplicó por tres (03), el cual hace referencia al valor del nivel de confianza correspondiente al 99%, mientras que para el límite de cuantificación se multiplicó por diez (10).

Tabla 4. Datos blancos de número de partículas y Fluorescencia (Radio Ch1/Ch2) para el cálculo del Límite de Detección y Límite de Cuantificación.

BLANCOS	ANALISTA 1						ANALISTA 2					
	DÍA 1		DÍA 2		DÍA 3		DÍA 1		DÍA 2		DÍA 3	
	Part.	Ch1/Ch2	Part.	Ch1/Ch2	Part.	Ch1/Ch2	Part.	Ch1/Ch2	Part.	Ch1/Ch2	Part.	Ch1/Ch2
BCO 1	232	97	103	169	400	200	543	232	454	329	765	109
BCO 2	999	162	700	321	1002	89	1045	125	499	337	265	153
BCO 3	1098	121	999	289	1786	305	1098	306	2020	99	798	112
BCO 4	3109	301	2627	301	378	350	654	97	7846	105	9786	300
BCO 5	10002	321	871	341	542	245	1224	322	1077	311	894	310

En la tabla 4 se puede observar valores entre 232 y 10002 partículas registradas en las lecturas de los blancos. Al mezclar una muestra de agua (Agua marina/estuarina, agua de mar sintética, agua pura “Milli q”) con el FDA, se produce un precipitado que también es fluorescente (Tsukiyama *et al.*, 1984; Fluid Imaging Technologies, 2006 y Lee *et al.*, 2015). Esto ocurrió con las muestras de blancos aplicadas para la determinación de los límites de detección y cuantificación (Fig. 1). Estas imágenes (Precipitado FDA y Burbujas de aire) emitidas por el FlowCam fueron identificadas y eliminadas para el recuento de células vivas, obteniendo un valor final de cero, tanto para partículas como para picos de fluorescencias registrados en los canales 1 y 2.

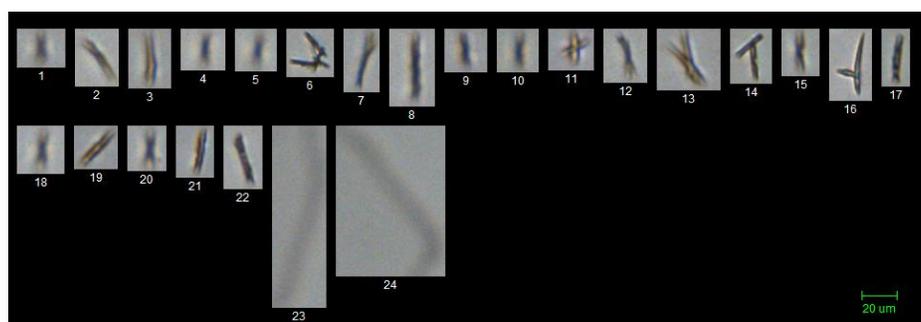


Figura 1. Imágenes de ejemplo de precipitados FDA registrados en las muestras de agua de mar sintética (Blancos) para el cálculo de los límites de detección y cuantificación.

De acuerdo a lo descrito anteriormente es importante recalcar pese que el equipo cuente fragmentos como partículas, para fines de esta validación se llegó a la conclusión que el mínimo cuantificable es un (01) individuo, independientemente del taxón del fitoplancton (célula) (tabla 5). Esta decisión se debe a que la abundancia del fitoplancton es medida a través de células y el mínimo

contable es una (01) célula, tanto para microscopia como para citometría de flujo, variando únicamente su forma y tamaño (Edler y Elbrächter, 2010).

Tabla 5. Límite de Detección y Límite de Cuantificación para el método.

LÍMITES	VALOR OBTENIDO
Límite de Detección	1 célula
Límite de Cuantificación	1 célula

Con respecto a la fluorescencia en la figura 2 muestra los resultados del ensayo de lecturas de blancos. El grafico muestra un patrón de fluorescencia similar para las lecturas de blancos, los cuales emitieron una fluorescencia máxima entre 89 y 350 del total de las partículas (Fig. 1).

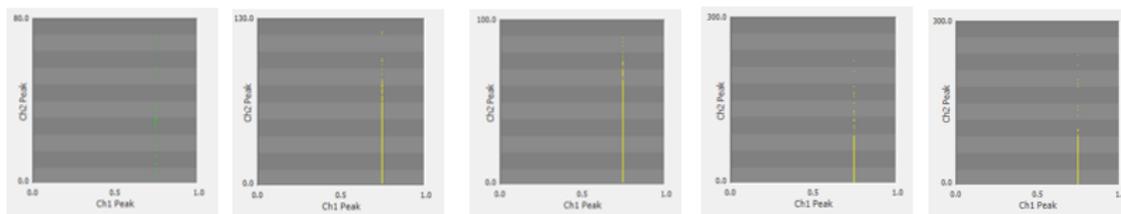


Figura 2. Patrón de fluorescencia de blancos de Fluorescencia (Radio Ch1/Ch2) para el cálculo del Límite de Detección y Límite de Cuantificación.

A pesar del precipitado fluorescente registrado en los ensayos de blancos, producto de la mezcla de la muestra de agua con el FDA, se tuvieron en cuenta para determinar los límites de detección y cuantificación, y esto se debe a que a toda muestra que se le aplique el reactivo generará el mismo resultado observado en el ensayo descrito (imágenes de precipitados de FDA), por lo tanto, a partir de los datos registrados se determinaron los límites de la validación con relación a la fluorescencia (tabla 6).

Tabla 6. Límite de Detección y Límite de Cuantificación para el método.

LÍMITES	VALOR OBTENIDO
Límite de Detección	518,4 Fluorescencia
Límite de Cuantificación	1194,7 Fluorescencia

2. PRUEBA DE FLUORESCENCIA EN MUESTRA NATURAL PROVENIENTE DE UN ECOSISTEMA EUTRÓFICO.

Se colectaron un total de 5 muestras en un ecosistema eutrófico (Bahía de Cartagena) mediante arrastres verticales superficiales con redes cónicas de 30 cm de diámetro de boca y tamaño de poro de 20 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 , 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. A partir de la muestra pos-filtrada se tomaron dos submuestra de 1 ml, a una submuestra que para este estudio fue denominada MNCFDA, se le aplicó 45 μL de la solución de FDA, mientras que a la segunda muestra no se le aplicó dicha solución y fue denominada MNSFDA, ambas muestras se dejaron en reposo a temperatura ambiente durante 10 minutos para su posterior análisis en el FlowCam.

En la figura 3 se registran Los resultados de los datos y las imágenes de las partículas (Fitoplancton, precipitado y materia orgánica) teñidas con FDA y sin teñir. Al usar la tinción de FDA con una muestra natural, se registra un radio Ch1/Ch2 (Fluorescencia 546.7), mientras que, en la muestra natural sin teñir se registró un radio Ch1/Ch2 de fluorescencia máxima de 356,56. De igual forma ocurre con los picos del canal 2 (Ch2) en el cual los valores son mayores con muestras teñidas que con muestras sin teñir.

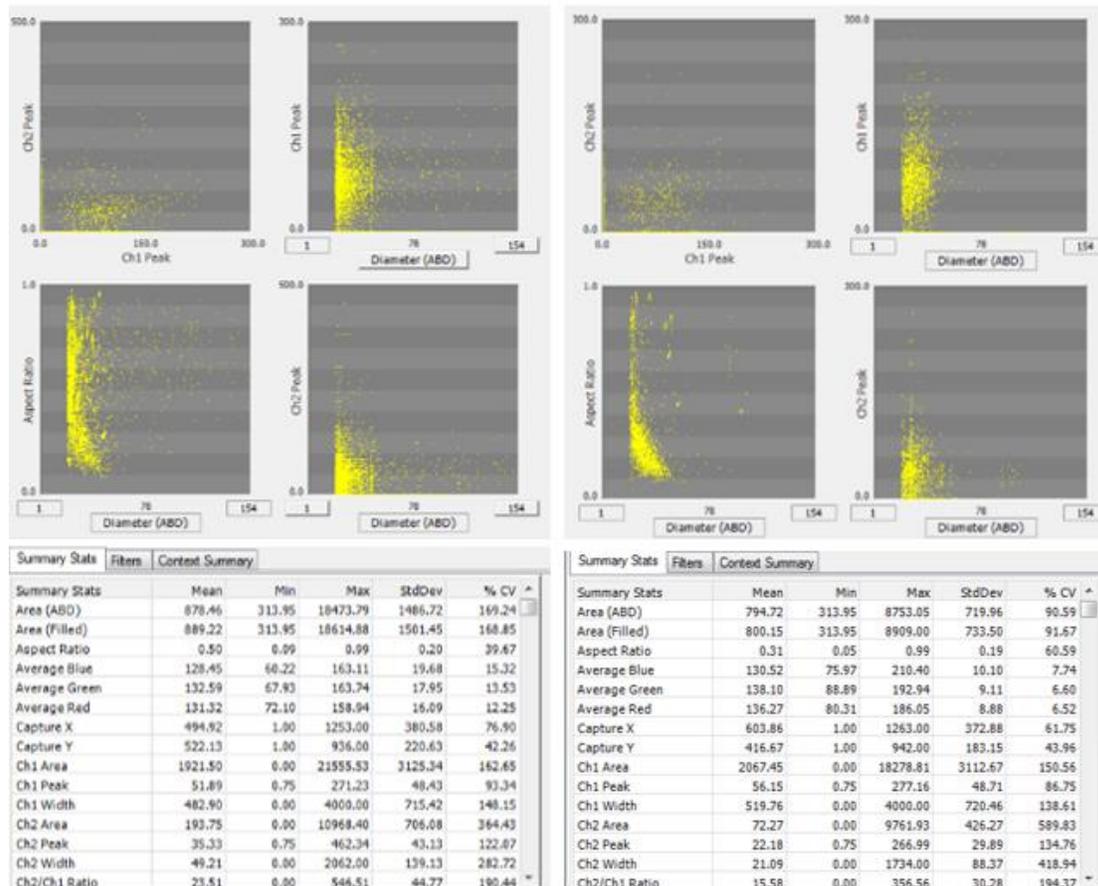


Figura 3. (Izquierda) Muestra Natural teñida (CFDA) vs (Derecha) Muestra Natural sin teñir (SFDA) (Derecha).

Si bien, a pesar de que la fluorescencia de la muestra teñida fue mayor que la de sin teñir, la diferencia no fue alta; lo que nos puede indicar que posiblemente se presentó una poca variabilidad o absorbancia de tinción entre diferentes especies de la muestra natural o condiciones de descenso de la comunidad fitoplanctónica, proceso que se da normalmente en aguas eutrofizadas como la Bahía de Cartagena.

Notas técnicas publicadas por Yokogawa Fluid Imaging Technologies, registran una buena absorción del FDA tanto en muestras naturales como en cultivos de algas, obteniendo un valor aproximadamente de 3114 en el canal de fluorescencia verde (Ch2), quintuplicando los valores obtenidos en la presente validación.

Con respecto a las condiciones de descenso de la comunidad fitoplanctónica, es importante resaltar que, la eutrofización es el proceso por el cual un cuerpo de agua es enriquecido con nutrientes

limitantes para el fitoplancton, principalmente fósforo y nitrógeno, y en algunas ocasiones silicio, potasio, hierro o manganeso. Estos nutrientes promueven el crecimiento excesivo de algas y su acumulación, las cuales se descomponen por la intervención de organismos aerobios presentes en el sistema, acelerando su ciclo de vida y generando de manera rápida un descenso de la comunidad fitoplanctónica, ya sea por muerte o depredación (Zouiten, 2012).

Por otra parte, se realizaron pruebas con muestras naturales para determinar el rango idóneo para determinar la viabilidad de organismos fitoplanctónicos. Se dividieron cuatro intervalos en muestras aplicando FDA (Fig. 4).

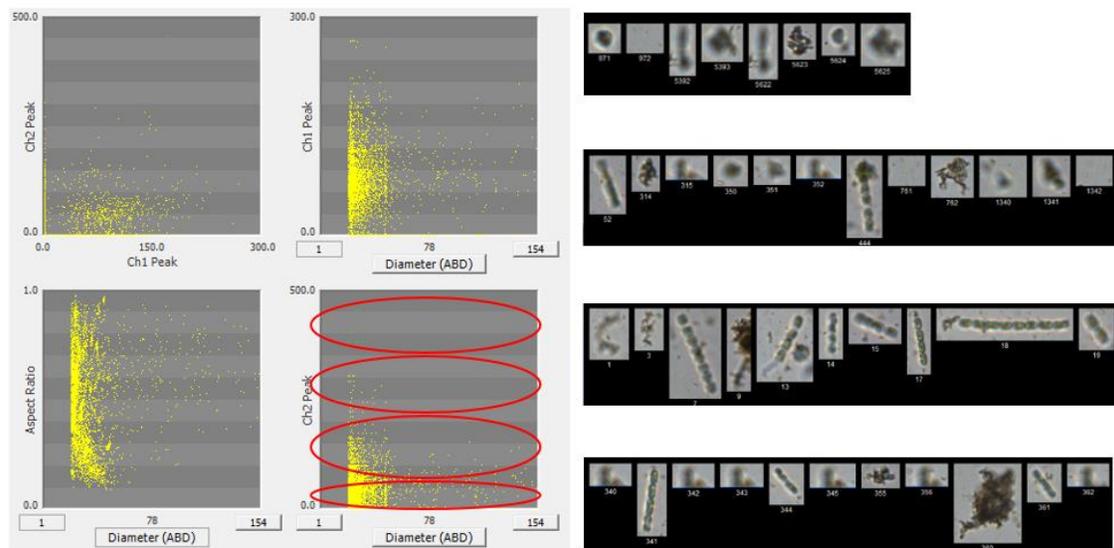


Figura 4. Pruebas con muestras naturales para determinar rango idóneo para determinar la viabilidad de organismos fitoplanctónicos basados en los picos de fluorescencia del canal 2 (Ch2). Dirección arriba – abajo, 1 = Rango (388 – 462); 2 = Rango (201 – 310); 3 = Rango (7,8 – 164) y 4 = Rango (0,75 – 25,57).

Se reportan 5630 partículas emisoras de fluorescencia, dentro de las cuales 8 hacen parte del primer rango determinado en el ensayo, cubriendo valores entre 388 y 462 de fluorescencia, se puede observar claramente que las partículas capturadas se trataban de precipitados del FDA. El segundo rango se reporta desde 201 a 310 de fluorescencia, registrando un total de 33 partículas, las cuales unos son consideradas células fitoplanctónicas y otros precipitados del FDA, El tercer rango (3328 partículas) y cuarto rango (2804 partículas) con valores entre 7,8 – 164 y 0,75 – 25,57 de fluorescencia, respectivamente, se pudo observar que cubrían un mayor número de células fitoplanctónicas, sin embargo, se puede detallar que las fluorescencias emitidas fueron mínimas, no superando el límite de detección establecido en el presente ensayo, por lo que se concluye que los datos obtenidos no son suficientes para determinar un rango de trabajo para la determinación de viabilidad, por lo tanto, es necesario realizar la prueba descrita con un cultivo de algas fitoplanctónica, con el fin de obtener valores homogéneos provenientes de una sola especie.

CONCLUSIONES

En este estudio se abordaron tres tipos de matrices: 1) Agua de Mar Sintética, Agua de Mar Natural y 3) Solución Madre (FDA) preparada en acetona grado analítico. La primera fue usada para blancos con el fin de determinar el Límite de Detección y Límite de Cuantificación, mientras que las dos últimas fueron utilizadas para realizar prueba de fluorescencia en muestras naturales provenientes

de un ecosistema eutrófico. Para fines de esta validación se llegó a la conclusión que el mínimo cuantificable es un (01) individuo, independientemente del taxón del fitoplancton (célula). Esta decisión se debe a que la abundancia del fitoplancton es medida a través de células y el mínimo contable es una (01) célula, tanto para microscopia como para citometría de flujo, variando únicamente su forma y tamaño, mientras que para la fluorescencia el límite de detección fue de 518,4.

Con respecto a las pruebas de fluorescencia en muestra natural proveniente de un ecosistema eutrófico, al usar la tinción de FDA con una muestra natural, se registra un radio Ch1/Ch2 (Fluorescencia 546.7), mientras que, en la muestra natural sin teñir se registró un radio Ch1/Ch2 de fluorescencia máxima de 356,56. De igual forma ocurre con los picos del canal 2 (Ch2), lo que nos puede indicar que posiblemente se presentó una poca variabilidad o absorbanza de tinción entre diferentes especies de la muestra natural o condiciones de descenso de la comunidad fitoplanctónica, proceso que se da normalmente en aguas eutrofizadas como la Bahía de Cartagena.

Por otra parte, se realizaron pruebas con muestras naturales para determinar el rango idóneo para determinar la viabilidad de organismos fitoplanctónicos. Se dividieron cuatro intervalos en muestras aplicando FDA, evidenciando que las fluorescencias emitidas fueron mínimas, no superando el límite de detección establecido en el presente ensayo, por lo que se concluye que los datos obtenidos no son suficientes para determinar un rango de trabajo para la determinación de viabilidad, por lo tanto, es necesario realizar la prueba descrita con un cultivo de algas fitoplanctónica, con el fin de obtener valores homogéneos provenientes de una sola especie.

RECOMENDACIONES

Para la determinación de viabilidad a través de citometría de flujo se recomienda utilizar perlas fluorescentes verdes para asegurarse de que el detector de Ch2 esté funcionando como se espera. Estos emitirán fluorescencia y serán detectados por el Canal 2 en la cámara de flujo con láser de 488 nm, a su vez, sirven como patrón de referencia, necesario para validar un método analítico.

Por otra parte, es necesaria la adquisición de muestras naturales vivas con muestras naturales muertas (por calor), y determinar si existe alguna diferencia entre los dos tratamientos al teñir con FDA. Es necesario realizar pruebas con aguas naturales provenientes de ecosistemas oligotróficos, ya que, al ser un sistema de menor complejidad, el material orgánico disperso visualmente es poco notorio.

Por último, para tener mayor nivel de confianza en el método es necesario utilizar reactivos que no solamente tiñan células vivas, sino también muertas, uno de estos reactivos es el SYTOX. 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). 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). Una combinación del FDA con el SYTOX sería esencial para obtener datos certeros y confiables para la determinación de viabilidad de células en muestras de agua de lastre.

REFERENCIAS

Adams, J. K. *et al.* (2014) Evaluating the response of freshwater organisms to vital staining. *Manag. Biol. Invasions*, 5, 197–208.

Austero, N. (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.

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.

Edler, L. y Elbrächter, M. (2010). El método de Utermöhl para el análisis cuantitativo del fitoplancton. *Métodos microscópicos y moleculares para el análisis cuantitativo del fitoplancton*, 110, 13-20.

Fluid Imaging Technologies, 2006. FlowCAM Viability Processing Report Ballast Water Testing AnalysisFlowCAM.

Fluid Imaging Technologies, 2006. Assessing Cell Viability Using FDA Stain

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.

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.

Lee, J., Choi, E. y Rhie, K. (2015). Validación de la viabilidad de las algas tratadas con oxidante residual total y materia orgánica mediante citometría de flujo. *Boletín de contaminación marina*, 97 (1-2), 95-104.

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>.

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.

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.

Tsukiyama, F., Katoh, M. y Matsuo, Y. (1984). Modification of the fluorescent staining method for mycobacterial cells. *Hiroshima journal of medical sciences*, 33(2), 293-295.

Zetsche, E. M. y Meysman, F. J. R. (2012) Dead or alive? Viability assessment of micro- and mesoplankton. *J. Plankton Res.*, 34, 493–509.

Zouiten, H. (2012). Análisis mediante modelado avanzado de procesos de eutrofización en lagunas litorales: aplicación a masas de agua atlánticas y mediterráneas.