



FORMATO INFORME DE SELECCIÓN, VALIDACIÓN O VERIFICACIÓN DE MÉTODO DE ENSAYO

Proceso: M5 Protección del Medio Marino
Código: M5-00-FOR-065
Versión: 0

INFORME DE SELECCIÓN, VALIDACIÓN O VERIFICACIÓN DE MÉTODO DE ENSAYO SELECTION, VALIDATION OR VERIFICATION TEST METHOD REPORT

Número de Informe
Report number

Fecha de emisión
Date of Issue

2021	12	17
-------------	-----------	-----------

1 **Tipo de informe** *Report type*

Selección **Validación** **Verificación**
Selection *Validation* *Verification*

2 **Descripción del método** *Method description*

Objetivo
Aim
 : Validar el método citometría de flujo para la determinación de viabilidad de organismos fitoplanctónicos en aguas de lastre en aguas de lastre de buques de tráfico marítimo nacional y extranjero) por el Laboratorio del CIOH (Procedimiento en revisión).

Alcance
Scope
 : Este procedimiento aplica para la determinación de organismos viables en aguas de lastre en buques de tráfico nacional y extranjero para verificar el estándar de cumplimiento de la regla D2, artículo 6 de la Resolución 477/2012 a través del uso de citometría de flujo por fluorescencia.

Método
Method
 : Determinación de viabilidad de organismos fitoplanctónicos en aguas de lastre de buques de tráfico marítimo nacional y extranjero

Tipo de Método
Method type
 :

Cualitativo <input checked="" type="checkbox"/>	Cuantitativo <input checked="" type="checkbox"/>
<i>Qualitative</i>	<i>Quantitative</i>
Normalizado <input checked="" type="checkbox"/>	Normalizado modificado <input type="checkbox"/>
<i>Normalized</i>	<i>Normalized modified</i>
No Normalizado <input type="checkbox"/>	Desarrollado por Dimar <input type="checkbox"/>
<i>Not Normalized</i>	<i>Developed by Dimar</i>

Analito y/o mesurando
Analyte and/or measuring
 : Fluorescencia

Unidades
Units
 : Cel/ml

Intervalo de trabajo
Analysis range
 : 1 – 500 cel/m³

Matriz (o Matrices)
Matrix (Or matrices)
 : Aguas de lastre, Agua marina y/o Estuarina

Temperatura Análisis [°C]
Test temperature [°C]
 : ≥ 20.0

Humedad Relativa [%]
Relative Humidity [%]
 : ≥ 53.1



FORMATO INFORME DE SELECCIÓN, VALIDACIÓN O VERIFICACIÓN DE MÉTODO DE ENSAYO

Proceso: M5 Protección del Medio Marino
Código: M5-00-FOR-065
Versión: 0

INFORME DE SELECCIÓN, VALIDACIÓN O VERIFICACIÓN DE MÉTODO DE ENSAYO SELECTION, VALIDATION OR VERIFICATION TEST METHOD REPORT

Número de Informe
Report number

Número de páginas
Amount of pages : 13

Observaciones adicionales
Additional observations : Ninguna

3 Identificación de materiales, insumos o equipos empleados *Materials, Supplies or Equipment used*

Equipos, instrumentos y materiales empleados <i>Equipment, instruments and supplies used</i>					
Nombre <i>Name</i>	Fabricante <i>Manufacturer</i>	Modelo <i>Model</i>	Certificado de Calibración y/o Calificación <i>Calibration or certification report</i>		Incertidumbre <i>Uncertainty</i>
			Fecha <i>Date</i>	Número <i>ID Number</i>	
FlowCAM	Fluid Imaging Technologies	VS-4	S/C	S/N	S/C
Nevera	Panasonic	MPR-414F-PA	07/04/2021	MI-13190	±2.2°C
Congelador	Panasonic	MPR-414F-PA	07/04/2021	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



FORMATO INFORME DE SELECCIÓN, VALIDACIÓN O VERIFICACIÓN DE MÉTODO DE ENSAYO

Proceso: M5 Protección del Medio Marino
Código: M5-00-FOR-065
Versión: 0

INFORME DE SELECCIÓN, VALIDACIÓN O VERIFICACIÓN DE MÉTODO DE ENSAYO SELECTION, VALIDATION OR VERIFICATION TEST METHOD REPORT

Número de Informe
Report number

Equipos, instrumentos y materiales empleados <i>Equipment, instruments and supplies used</i>					
Nombre <i>Name</i>	Fabricante <i>Manufacturer</i>	Modelo <i>Model</i>	Certificado de Calibración y/o Calificación <i>Calibration or certification report</i>		Incertidumbre <i>Uncertainty</i>
			Fecha <i>Date</i>	Número <i>ID Number</i>	
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) <i>Reagents and reference material</i>						
Nombre <i>Name</i>	Referencia <i>Reference</i>	Lote <i>Batch</i>	Fecha venc. <i>Expiration date</i>	Concentración <i>Concentration</i>	Pureza <i>Purity</i>	Incertidumbre <i>Uncertainty</i>
Fluorescein Diacetate (FDA)	INVITROGEN	2333068	Nov/2022	5mg/ml	N/A	N/A
Acetona grado analítico	J.T. BAKER	B03W79	08/03/2024	99.5%	99.74%	N/A

4 Parámetros para la selección, validación o verificación del método *Method selection, validation or verification parameters*

Linealidad <i>Linearity</i>	<input type="checkbox"/>	Sensibilidad <i>Sensibility</i>	<input type="checkbox"/>	Intervalo de trabajo <i>Work interval</i>	<input checked="" type="checkbox"/>
Selectividad <i>Selectivity</i>	<input type="checkbox"/>	Veracidad <i>Veracity</i>	<input checked="" type="checkbox"/>	Precisión <i>Precision</i>	<input checked="" type="checkbox"/>
Robustez <i>Ruggedness</i>	<input checked="" type="checkbox"/>	Incertidumbre <i>Uncertainty</i>	<input checked="" type="checkbox"/>	Límite de Detección <i>Detection limit</i>	<input checked="" type="checkbox"/>
Límite de Cuantificación <i>Quantification limit</i>	<input checked="" type="checkbox"/>	Otros <i>Others</i>	<input checked="" type="checkbox"/>	Probabilidad de falso/positivo	<input type="checkbox"/>



FORMATO INFORME DE SELECCIÓN, VALIDACIÓN O VERIFICACIÓN DE MÉTODO DE ENSAYO

Proceso: M5 Protección del Medio Marino
Código: M5-00-FOR-065
Versión: 0

INFORME DE SELECCIÓN, VALIDACIÓN O VERIFICACIÓN DE MÉTODO DE ENSAYO *SELECTION, VALIDATION OR VERIFICATION TEST METHOD REPORT*

Número de Informe
Report number

5 **Resultados de los Parámetros de Selección/Validación/Verificación** *Results obtained for the selection/validation/verification parameters*

Describir cada uno de los parámetros seleccionados en el numeral 4, incluyendo el valor obtenido y el criterio de aceptación.

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.



FORMATO INFORME DE SELECCIÓN, VALIDACIÓN O VERIFICACIÓN DE MÉTODO DE ENSAYO

Proceso: M5 Protección del Medio Marino
Código: M5-00-FOR-065
Versión: 0

INFORME DE SELECCIÓN, VALIDACIÓN O VERIFICACIÓN DE MÉTODO DE ENSAYO SELECTION, VALIDATION OR VERIFICATION TEST METHOD REPORT

Número de Informe
Report number

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 DE LOS PARÁMETROS DE VERIFICACIÓN

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

Descripción: 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:

Descripción: 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.

Resultados:

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 1. 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



FORMATO INFORME DE SELECCIÓN, VALIDACIÓN O VERIFICACIÓN DE MÉTODO DE ENSAYO

Proceso: M5 Protección del Medio Marino
Código: M5-00-FOR-065
Versión: 0

INFORME DE SELECCIÓN, VALIDACIÓN O VERIFICACIÓN DE MÉTODO DE ENSAYO SELECTION, VALIDATION OR VERIFICATION TEST METHOD REPORT

Número de Informe
Report number

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 1 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.

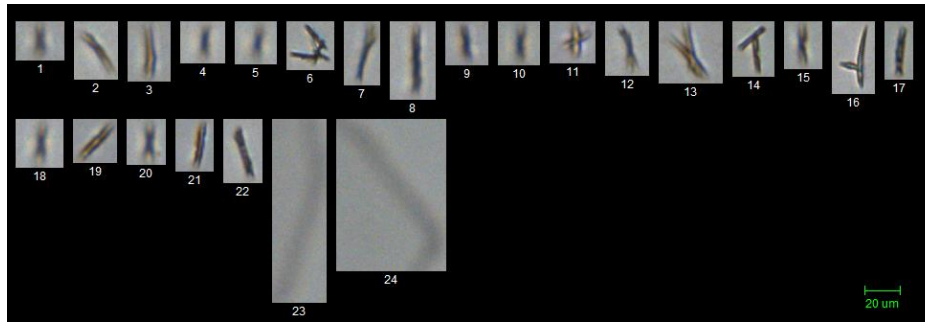


Figura 1. Imágenes de ejemplo de precipitados FDA registrados en las muestras de agua de mar sintética (Blancos) para el cálculo de los límites de detección y cuantificación.

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).

De esta manera, se establecen los siguientes valores como Límite de Detección y cuantificación para el método (Tabla 2-3):

Tabla 2. Límite de Detección y Límite de Cuantificación para el método (Conteo).

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 gráfico 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



FORMATO INFORME DE SELECCIÓN, VALIDACIÓN O VERIFICACIÓN DE MÉTODO DE ENSAYO

Proceso: M5 Protección del Medio Marino
Código: M5-00-FOR-065
Versión: 0

INFORME DE SELECCIÓN, VALIDACIÓN O VERIFICACIÓN DE MÉTODO DE ENSAYO SELECTION, VALIDATION OR VERIFICATION TEST METHOD REPORT

Número de Informe
Report number

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 3).

Tabla 3. Límite de Detección y Límite de Cuantificación para el método (Fluorescencia).

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 μ m. 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 μ m, 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 μ L 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 2 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.



FORMATO INFORME DE SELECCIÓN, VALIDACIÓN O VERIFICACIÓN DE MÉTODO DE ENSAYO

Proceso: M5 Protección del Medio Marino
 Código: M5-00-FOR-065
 Versión: 0

INFORME DE SELECCIÓN, VALIDACIÓN O VERIFICACIÓN DE MÉTODO DE ENSAYO SELECTION, VALIDATION OR VERIFICATION TEST METHOD REPORT

Número de Informe
 Report number

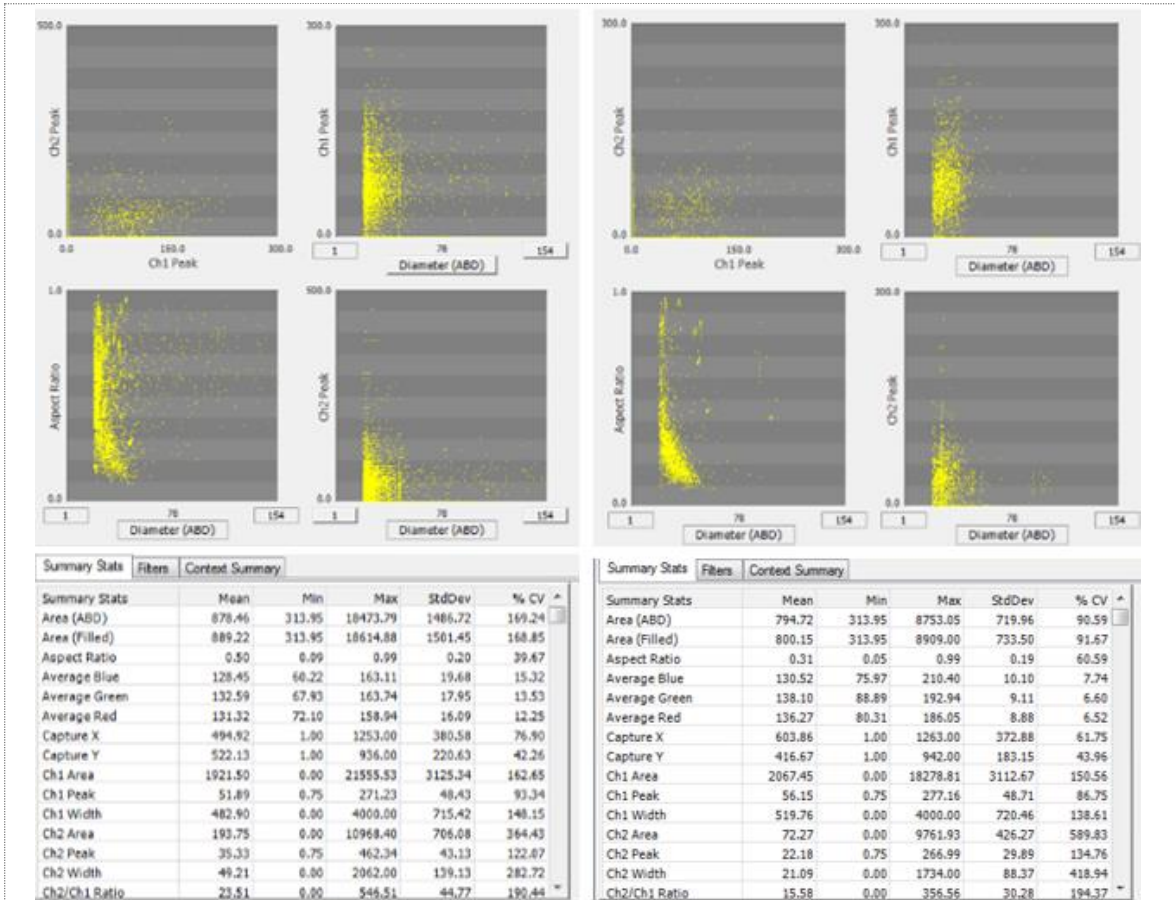


Figura 2. (Izquierda) Muestra Natural teñida (CFDA) vs (Derecha) Muestra Natural sin teñir (SFDA) (Derecha)

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



FORMATO INFORME DE SELECCIÓN, VALIDACIÓN O VERIFICACIÓN DE MÉTODO DE ENSAYO

Proceso: M5 Protección del Medio Marino
Código: M5-00-FOR-065
Versión: 0

INFORME DE SELECCIÓN, VALIDACIÓN O VERIFICACIÓN DE MÉTODO DE ENSAYO SELECTION, VALIDATION OR VERIFICATION TEST METHOD REPORT

Número de Informe
Report number

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. 3).

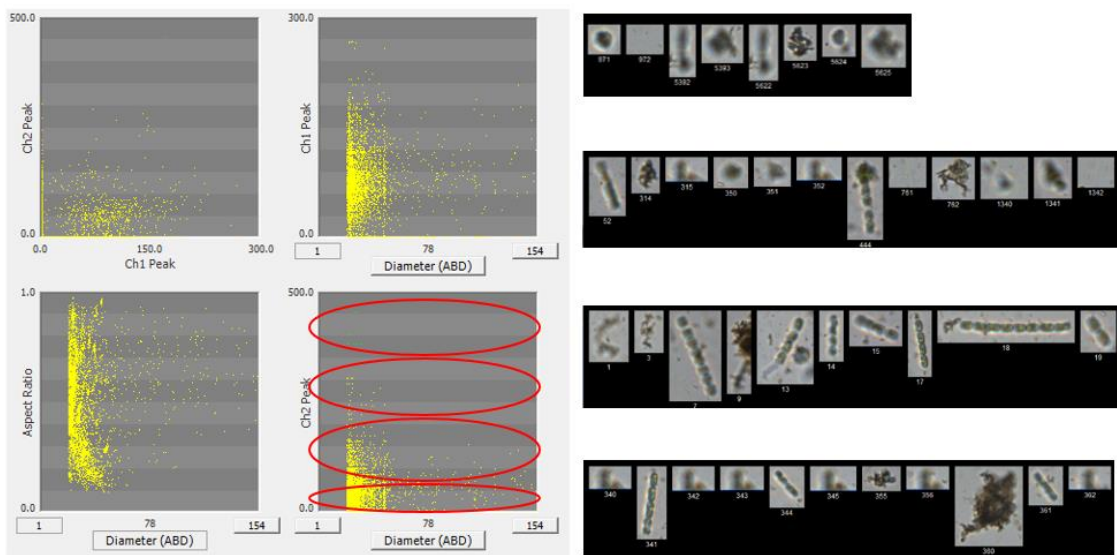


Figura 3. Pruebas con muestras naturales para determinar rango idóneo para determinar la viabilidad de organismos fitoplanctónicos basados en los picos de fluorescencia del canal 2 (Ch2). Dirección arriba – abajo, 1 = Rango (388 – 462); 2 = Rango (201 – 310); 3 = Rango (7,8 – 164) y 4 = Rango (0,75 –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



FORMATO INFORME DE SELECCIÓN, VALIDACIÓN O VERIFICACIÓN DE MÉTODO DE ENSAYO

Proceso: M5 Protección del Medio Marino
Código: M5-00-FOR-065
Versión: 0

INFORME DE SELECCIÓN, VALIDACIÓN O VERIFICACIÓN DE MÉTODO DE ENSAYO *SELECTION, VALIDATION OR VERIFICATION TEST METHOD REPORT*

Número de Informe
Report number

6 **Conclusiones** *Conclusions*

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 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.

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.

7 **Relación de anexos** *List of attachments*

Anexo 1: Informe preliminar: Avance validación del método citometría de flujo para la determinación de viabilidad de organismos fitoplanctónicos en aguas de lastre y aguas marinas y/o estuarinas



FORMATO INFORME DE SELECCIÓN, VALIDACIÓN O VERIFICACIÓN DE MÉTODO DE ENSAYO

Proceso: M5 Protección del Medio Marino
Código: M5-00-FOR-065
Versión: 0

INFORME DE SELECCIÓN, VALIDACIÓN O VERIFICACIÓN DE MÉTODO DE ENSAYO *SELECTION, VALIDATION OR VERIFICATION TEST METHOD REPORT*

Número de Informe
Report number

8 **Observaciones adicionales** *Additional comments*

Para la determinación de viabilidad a través de citometría de flujo sería bueno 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 necesario comparar muestras naturales vivas con muestras naturales muertas, matadas por calor, y determinar si existe alguna diferencia entre los dos tratamientos al tefir 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.

9 **Bibliografía y/o documentos relacionados** *Bibliography and/or related documents*

- M5-00-PRO-026 Selección, validación, verificación métodos y calculo incertidumbre v1
- M5-00-FOR-055 Control de Blancos v0
- 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.



FORMATO INFORME DE SELECCIÓN, VALIDACIÓN O VERIFICACIÓN DE MÉTODO DE ENSAYO

Proceso: M5 Protección del Medio Marino
Código: M5-00-FOR-065
Versión: 0

INFORME DE SELECCIÓN, VALIDACIÓN O VERIFICACIÓN DE MÉTODO DE ENSAYO SELECTION, VALIDATION OR VERIFICATION TEST METHOD REPORT

Número de Informe
Report number

- 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.

10 **Revisión del Informe de selección, validación o verificación** *Selection, Validation or Verification report audit*

Aceptado
 Accepted

Rechazado
 Rejected

Fecha
 Date



**FORMATO
INFORME DE SELECCIÓN, VALIDACIÓN O
VERIFICACIÓN DE MÉTODO DE ENSAYO**

Proceso: M5 Protección del Medio Marino
Código: M5-00-FOR-065
Versión: 0

INFORME DE SELECCIÓN, VALIDACIÓN O VERIFICACIÓN DE MÉTODO DE ENSAYO
SELECTION, VALIDATION OR VERIFICATION TEST METHOD REPORT

Número de Informe
Report number

Realizado por
Done by

Aprobado por
Approved by

Nombre Luis Alberto De La Hoz
Name
Cargo Analista
Position

Nombre Joaquin Rivero
Name
Cargo Jefe de laboratorio
Position

FIN DEL INFORME
END OF REPORT