

VALIDACIÓN DE LA TÉCNICA DE VIABILIDAD ZOOPLANCTÓNICA MEDIANTE TINCIÓN CON ROJO NEUTRO



VALIDACIÓN DE LA TÉCNICA DE VIABILIDAD ZOOPLANCTÓNICA MEDIANTE TINCIÓN CON ROJO NEUTRO

Informe técnico
2023

Personal participante

**Daniela Yomaira Rojas
Sánchez**

Centro de Investigaciones
Oceanográficas e Hidrográficas
del Caribe

Tatiana Marín Amado

Centro de Investigaciones
Oceanográficas e Hidrográficas
del Caribe

Revisores

Liseth Johana Arregocés Silva

-Centro de Investigaciones
Oceanográficas e Hidrográficas
del Caribe

Sara Arenas -Subdirección de

Desarrollo Marítimo-Dirección
General Marítima

Citar documento como:

Dirección General Marítima. 2023. Validación de la técnica de viabilidad zooplanctónica mediante tinción con rojo neutro. Informe Técnico. Centro de Investigaciones Oceanográficas e Hidrográficas del Caribe. Cartagena. 37 p.

TABLA DE CONTENIDO

1. INTRODUCCIÓN	7
2. METODOLOGÍA	8
2.1. Matrices y colecta de muestras	8
2.1.1. <i>Matriz agua de mar natural.</i>	8
2.1.2. <i>Matriz agua de lastre tratada.</i>	8
2.2. Adición de reactivos	9
2.2.1. <i>Rojo neutro.</i>	9
2.2.2. <i>Formaldehído.</i>	9
2.3. Estandarización de la homogenización	9
2.4. Análisis de muestras	10
2.5. Pruebas previas	10
2.5.1. <i>Pruebas de tinción.</i>	10
2.5.2. <i>Pruebas de seguimiento.</i>	11
2.5.3. <i>Experimento pérdida de organismos.</i>	11
2.6. Pruebas de aseguramiento	12
2.6.1. <i>Blanco muestra.</i>	12
2.6.2. <i>Controles negativos.</i>	12
2.6.3. <i>Controles positivos.</i>	13
2.7. Muestras de matriz agua de lastre	13
2.6. Parámetros a calcular	14
2.6.1. <i>Límite de detección y límite de cuantificación</i>	14
2.6.2. <i>Repetibilidad</i>	15
2.6.3. <i>Recuperación</i>	16
2.6.4. <i>Incertidumbre</i>	17
2.6.5. <i>Tasa de falsos negativos</i>	17
2.6.6. <i>Tasa de falsos positivos</i>	17
3. RESULTADOS	18
3.1. Pruebas previas	18
3.1.1. <i>Pruebas de tinción</i>	18
3.1.2. <i>Pruebas de seguimiento</i>	19

3.1.3. Experimento prueba de pérdida de organismos	20
3.2. Aseguramiento de la calidad	21
3.2.1. Blanco muestra	21
3.2.2. Controles negativos	23
3.2.3. Controles positivos.....	23
3.4.2. Repetibilidad	26
3.4.3. Recuperación.....	27
3.4.4. Incertidumbre	28
3.4.5. Tasa de falsos negativos	28
3.4.6. Tasa de falsos positivos.....	29
4. DISCUSIÓN	29
4.1. Pruebas de tinción	29
4.2. Parámetros a calcular	30
5. CONCLUSIONES	34
6. RECOMENDACIONES	35
7. BIBLIOGRAFÍA	35

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Lecturas de un solo analista (A1) para el blanco enriquecido sin tamizar y post tamizado.	21
Tabla 2. Organismos considerados en cada control positivo analizado	24
Tabla 3. Resultados de lecturas de muestras en dos días considerando alícuotas diferentes (MAL independientes) y la misma alícuota (MAL dependientes).	25
Tabla 4. Comparaciones estadísticas (Pruebas de Wilcoxon) entre dos días y dos analistas para lecturas independientes y lecturas de la misma alícuota.	26
Tabla 5. Porcentajes de recuperación obtenidos en siete muestras revisadas por un único analista.	28
Tabla 6. Cálculo de incertidumbre del método.	28

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Organismos positivos a tinción con rojo neutro. (a) Molusco bivalvo, (b) Copépodo calanoideo, (c) Larva de poliqueto y (d) Nauplio de crustáceo.	18
Figura 2. Absorción del rojo neutro en tintínidos de los géneros <i>Leprotintinnus</i> y <i>Favella</i> . (a) Lórica de <i>Leprotintinnus</i> ligeramente coloreada, (b) Lórica vacía de <i>Favella</i> sin teñir y (c) <i>Favella</i> con célula viva y coloreada.	19
Figura 3. Pérdida de coloración transcurridos cinco días de la adición de rojo neutro sin añadir preservante. (a) Copépodo oithonido día 1 con coloración rosada y (b) copépodo oithonido día 5 con coloración marrón.	20
Figura 4. Comportamiento de blancos sin y con adición de preservante. (a) Blancos sin preservante con aglomeraciones, (b) observación microscópica de una alícuota de aglomeraciones y (c) blancos con adición de preservantes.	23
Figura 5. Organismos observados en los controles negativos. (a) nauplio y (b) copépodo.	23
Figura 6. Dendrogramas de similitud de Bray-Curtis para lecturas de dos analistas en dos días diferentes. (a) Alícuotas independientes y (b) alícuotas iguales.	27

1. INTRODUCCIÓN

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 (Kang *et al.*, 2010; Zetsche y Meysman, 2012; Austero, 2019). En relación al plancton y los invertebrados, la directriz D2 establece que las densidades máximas de descarga deben ser menores a 10 organismos viables por m³ para tamaños $\geq 50 \mu\text{m}$ y, menores a 10 organismos viables por ml para la fracción entre $10 \mu\text{m}$ y $50 \mu\text{m}$ (Adams *et al.*, 2014). Pero, ¿qué es un organismo viable?

Según Steinberg *et al.* (2012) se considera viable cualquier organismo o estado de vida que está vivo. 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. 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).

La tinción con rojo neutro (clorhidrato de 3-amino-7-dimetilamino-2-metilfenazina) se caracteriza por ser débilmente catiónica, soluble en agua, pasar a través de las membranas plasmáticas intactas y concentrarse 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.

Este documento recopila los fundamentos metodológicos de la aplicación de rojo neutro para verificar el cumplimiento de la regulación D2 y presenta los resultados obtenidos en pruebas realizadas en el Laboratorio Dimar sede Caribe con aguas de mar y aguas de lastre tratada con y sin adición de preservante durante 2023.

2. METODOLOGÍA

2.1. Matrices y colecta de muestras

2.1.1. *Matriz agua de mar natural.* Las muestras se colectaron con red de plancton de 30 cm de diámetro y 80 μm de poro mediante arrastre horizontal en el muelle del CIOH. Dado que esta matriz únicamente fue empleada para pruebas cualitativas, el volumen filtrado no fue considerado.

2.1.2. *Matriz agua de lastre tratada.* Para esta matriz se empleó la misma red indicada en el apartado anterior. Se colectaron muestras a bordo del buque MV Katherine, el cual contaba con sistema de tratamiento de filtración + UV. En este caso se realizaron tres arrastres verticales a 2 m de profundidad y según lo indicado en la Ec. 1, donde el diámetro de la red es 0.3 y h es 6 m, se filtraron 0.42 m^3 de agua por muestra.

Ec. 1

$$VF = \frac{\pi * diametro^2 * h}{4}$$

Las muestras colectadas en las dos matrices fueron almacenadas en recipientes ámbar nalgene de 250 ml.

2.2. Adición de reactivos

2.2.1. *Rojo neutro*. De acuerdo a lo sugerido por Yáñez (2022, com pers) se preparó una solución stock de rojo neutro (0.5 % p/v) adicionando 0.25 g de rojo neutro en polvo a 500 ml de agua MilliQ. Esta solución se mantuvo bajo condiciones de refrigeración y fue empleada para todos los experimentos señalados en el numeral 2.5 y 2.6. En todas las matrices se adicionaron 5 ml de solución stock a cada muestra dejando actuar el colorante durante mínimo 20 minutos antes de la revisión microscópica o de adicionar el preservante. Durante el proceso de validación 2023 se trabajó con la misma solución preparada en 2022, previa comprobación de su funcionalidad (Ver resultados).

2.2.2. *Formaldehído*. Se empleó formaldehído al 37 % neutralizado con tetraborato de sodio (pH cercano a 7). Considerando que el volumen de muestra promedio fue de 50 ml se adicionaron 6 ml de formaldehído a cada una de las muestras de los tratamientos con preservante para alcanzar una concentración final de 4 %.

2.3. Estandarización de la homogenización

Con el fin de disminuir la desviación estándar entre las lecturas se hicieron cambios respecto al proceso de homogenización planteado en 2022. Se reemplazó la homogenización con termoagitadora ya que el proceso requería el uso de magnetos al cual se adherían partículas y probablemente organismos, aumentando así el riesgo de pérdida de organismos y la contaminación cruzada entre muestras. En 2023, cada muestra fue agitada de manera manual mediante 20 movimientos rotativos laterales suaves antes de la extracción de cada alícuota.

2.4. Análisis de muestras

Con una transferpipeta de 100-1000 μL se tomaron alícuotas de 1 ml de cada muestra que fueron analizadas en una cámara Sedgwick-Rafter bajo microscopio invertido Olympus IX73. La totalidad de la cámara fue revisada a un aumento mínimo de 10X. Se realizó registro fotográfico y de video de los organismos observados y únicamente se cuantificaron aquellos con tamaño $\geq 50 \mu\text{m}$ y catalogados como zooplancton. Todas las fotos mostradas en este informe fueron capturadas bajo condiciones de máxima apertura del diafragma (máxima intensidad lumínica) para que puedan ser comparadas en términos de intensidad de tinción.

2.5. Pruebas previas

2.5.1. Pruebas de tinción. Previo al inicio de la validación se aplicó la tinción de viabilidad con rojo neutro a muestras colectadas en el muelle del CIOH para verificar la reacción de diferentes grupos taxonómicos al colorante. De igual modo se verificó si la solución preparada en 2022 continuaba siendo funcional. Dichas muestras no

fueron preservadas con el fin de corroborar la tinción de organismos con movilidad evidente.

2.5.2. Pruebas de seguimiento. Se colectaron siete muestras en el muelle del CIOH y tras homogenizar, de cada una se extrajo una alícuota de 1 ml la cual fue aislada en un tubo falcon. Posteriormente, se adicionaron 500 µl de rojo neutro a cada tubo, esperando mínimo 10 minutos para la absorción del colorante. Cada alícuota fue observada el día de la colecta (Día 1) y cinco días después (Día 2) haciendo anotaciones y capturando registro fotográfico sobre los organismos observados. Cabe aclarar que los tubos fueron mantenidos a condiciones ambiente (19-21 °C; ≤ 60 % H.R).

2.5.3. Experimento pérdida de organismos.

De cada una de las muestras mencionadas en el apartado anterior, se extrajo adicionalmente una alícuota de 1ml en la cual fueron cuantificados los tintínidos de los géneros *Leptotintinnus* y *Favella* únicamente. Tras registrar dicha información cada alícuota fue adicionada a un tubo falcon con 25 ml de agua triple filtrado, constituyendo de esta manera un blanco enriquecido. Cada blanco enriquecido fue concentrado mediante tamizado según lo mencionado en el numeral 2.7 y nuevamente almacenado en tubo falcon para su análisis. Para la cuantificación, la totalidad de cada blanco enriquecido fue observada por alícuotas de 1 ml. Mediante el contraste de los conteos iniciales y los conteos finales por blanco se obtuvo un estimado del porcentaje de organismos (%) que se pierde a través del proceso de tamizado. Se consideraron solamente tintínidos ya que al poseer una lórica rígida son más resistentes al proceso mecánico y, particularmente, los géneros

mencionados poseen formas conspicuas de fácil observación. En este experimento participó únicamente un analista. Con los resultados obtenidos se calculó el porcentaje de diferencia entre la lectura original y la lectura post tamizado y adicionalmente se realizó una prueba de signos de Wilcoxon con un nivel de confianza del 95 % para identificar la presencia de diferencias significativas.

2.6. Pruebas de aseguramiento

2.6.1. Blanco muestra. Participaron dos analistas durante tres días y se trabajaron dos experimentos: adición únicamente de rojo neutro y adición de rojo neutro más formaldehído. Se colectaron siete muestras de agua mar mediante arrastres horizontales según lo indicado en 2.1.1. Cada muestra colectada fue homogenizada y filtrada tres veces: primero a través de un filtro de clorofila GF/F de 47 mm de diámetro y 0.7 μm , luego a través de un filtro de GF/C del mismo diámetro y tamaño de poro y finalmente con un filtro de membrana de 0.45 μm . La muestra filtrada fue homogenizada según lo descrito en 2.3 y dividida en dos fracciones servidas en dos tubos falcon diferentes. Dependiendo del tratamiento, se adicionó el colorante y, en algunos casos, el preservante según lo mencionado en el apartado 2.2. Para este parámetro, cada analista revisó alícuotas independientes.

2.6.2. Controles negativos. Este experimento se desarrolló durante tres días y participaron dos analistas, es decir, se analizaron 7 muestras (1 alícuota por muestra por analista). En laboratorio cada muestra fue vertida en un beaker de 50 ml y calentada tres veces en termo agitador a una temperatura de 110 °C en ciclos de 15 min (Adams et al., 2014); cada ciclo de calentamiento fue realizado en días independientes para garantizar que los organismos que pudiesen haber resistido al

calor, murieran por falta de oxígeno. El último día de experimento, las muestras fueron dejadas en reposo hasta alcanzar la temperatura ambiente, tiempo tras el cual se adicionó el colorante. Para este parámetro no se trabajó experimento con preservante.

2.6.3. Controles positivos. En este experimento participaron dos analistas en la lectura, pero solo uno en el montaje dada la complejidad del manejo de los especímenes. De una muestra viva colectada en el muelle del CIOH, se extrajeron aleatoriamente 7 alícuotas de 20 µl. Cada alícuota fue servida en cámara Sedgwick-Rafter de 1 ml y se verificó la cantidad de organismos que presentaban movilidad, registrando el grupo o taxón y la cantidad de organismos. Posteriormente se adicionaron a la cámara 980 µl de agua de mar filtrada (triple filtrado según numeral 2.6.1). La totalidad de la alícuota (20 µl de muestra + 980 µl agua filtrada) fue traspasada con transferpipeta a tubos ependorf de 2 ml. A cada tubo se adicionó 1 ml de solución stock de rojo neutral y se dejó actuar durante mínimo 10 minutos. Cada alícuota fue analizada en términos de movilidad y tinción (positivo/negativo) y estos datos fueron contrastados con los datos obtenidos de forma previa a la tinción.

2.7. Muestras de matriz agua de lastre

Para los experimentos con agua de lastre tratada se realizaron lecturas de muestra concentrada. En el proceso de concentración, tras la aplicación de la tinción y el preservante, la totalidad de la muestra fue servida a través de un tamiz de nylon de 34 µm. El material retenido en el tamiz fue lavado cuidadosamente con agua de mar filtrada (triple filtrado) y envasado en un tubo falcon. Este procesamiento permitió concentrar las muestras de un volumen original de 380 ml a uno de 20 ml. En los

experimentos con muestras de matriz agua de lastre tratada participaron dos analistas, quienes analizaron siete muestras durante dos días. Cada analista realizó lecturas independientes de una alícuota de cada muestra en dos días diferentes. Adicionalmente, se trabajó con lecturas de la misma alícuota por los dos analistas. Tras la revisión la alícuota era reintegrada al tubo falcon. Únicamente se trabajó con tratamiento de rojo neutro más preservante. En total se llevaron a cabo los siguientes experimentos:

- Muestras de agua de lastre + rojo neutro + preservante, lectura de alícuotas independientes (7 lecturas diarias, 14 lecturas totales por analista)
- Muestras de agua de lastre + rojo neutro + preservante, lectura de la misma alícuotas (7 lecturas diarias, 14 lecturas totales por analista)

Al observar la misma alícuota se pretende establecer la variación entre el ojo de los analistas, mientras que con la observación de alícuotas independientes se busca conocer la dispersión de los datos de conteos de la muestra y que tanto varían las lecturas al ser realizadas en momentos diferentes.

2.6. Parámetros a calcular

2.6.1. Límite de detección y límite de cuantificación

Para el cálculo del límite de detección y cuantificación se emplearon las lecturas de los blancos con preservante de los dos analistas durante los tres días, siguiendo las ecuaciones 2 y 3 respectivamente.

Ec. 2

$$Lim\ det = Promedio + k * desvest$$

Donde *desvest* corresponde a la desviación estándar del conjunto de datos y el coeficiente *k* para un nivel de confianza del 99 % es igual a 3.

Ec. 3

$$Lim\ cuant = Promedio + 10 * desvest$$

Adicionalmente, con los datos de muestras de aguas de lastre tratadas se empleó la formula plasmada en First y Drake (2012) donde el límite de detección (*LD*) corresponde al cociente entre el valor mínimo que puede detectar el ojo humano (1 organismo), la fracción analizada de la muestra (*F*) y el volumen total de la muestra (*S*, m³). La fracción analizada corresponde a 0.053 (7 ml analizados) y el volumen total a la suma del volumen filtrado para cada muestra (0.42 m³ x 7 muestras = 2.94 m³).

Ec. 4

$$LD = \frac{1\ Org}{F \times S}$$

2.6.2. Repetibilidad

La repetibilidad fue calculada tanto con los datos de las lecturas simultaneas por analista como con las lecturas independientes por analista, en ambos casos, durante dos días. Para cada día se calculó el promedio, la desviación estándar y el coeficiente de variación. Para la estimación de este último se empleó la ecuación 5.

Ec. 5

$$CV = \frac{desvest * 100}{Promedio}$$

Adicionalmente, se realizaron pruebas de Wilcoxon con un nivel de confianza del 95 % para identificar la presencia de diferencias significativas. Para el caso de las lecturas de alícuotas diferentes se aplicó una prueba de suma de rangos de Wilcoxon (muestras independientes); esta misma prueba se aplicó para la comparación entre días de lecturas de la misma alícuota. Para el contraste entre lecturas de la misma alícuota revisadas por diferentes analistas se aplicó una prueba de signos de Wilcoxon (muestras dependientes). Tanto con los datos de las lecturas independientes de cada analista por día como con los de lecturas simultaneas, se realizó un análisis de similitud de Bray-Curtis, considerando los organismos teñidos y sin teñir como taxones diferentes y sus respectivas densidades para ver la similitud entre el conjunto de datos de cada analista.

2.6.3. Recuperación

El cálculo de este parámetro tuvo en cuenta los datos del experimento de pérdida de organismos (ver 2.5.3) para un solo analista y un solo día de lectura. Se empleó el valor original (muestra sin tamizar) como valor de referencia y se estimó el porcentaje de recuperación (% R) de acuerdo con la ecuación 6 donde la lectura corresponde al análisis post tamizado.

Ec. 6

$$\%R = \frac{Lectura}{Promedio} * 100$$

2.6.4. Incertidumbre

Se consideró la incertidumbre estándar, la incertidumbre combinada y la incertidumbre expandida asociada a los equipos, la vidriería y los datos de repetibilidad. Se tomaron como base los lineamientos establecidos en Eurachem/CITAC (2012). La incertidumbre total se calculó sumando la incertidumbre de cada uno de los componentes mencionados y asumiendo una distribución normal.

2.6.5. Tasa de falsos negativos

La estimación de este parámetro consideró los resultados de los controles negativos y positivos durante un día según lo planteado en la ecuación 7, donde *VP* son los verdaderos positivos y *FN* los falsos negativos.

Ec 7.

$$TFN = [1 - \frac{VP}{VP + FN}]$$

2.6.6. Tasa de falsos positivos

Se emplearon los datos de los controles negativos y positivos y se reemplazaron en la ecuación 8.

Ec 8.

$$TFP = [1 - \frac{VN}{FP + VN}]$$

Donde *VN* corresponde a los verdaderos negativos y *FP* a los falsos positivos.

3. RESULTADOS

3.1. Pruebas previas

3.1.1. Pruebas de tinción

Se observó que la tinción funciona en diferentes organismos cuya condición de “vivo” pudo ser corroborada por motilidad. Entre los organismos teñidos se identificaron moluscos, copépodos, larvas de poliqueto y nauplios, indicando que la tinción es útil para diferentes grupos zooplanctónicos (Fig. 1). Otro hallazgo importante es que la solución de rojo neutro continúa siendo funcional luego de un año de ser preparada y almacenada en condiciones de refrigeración.

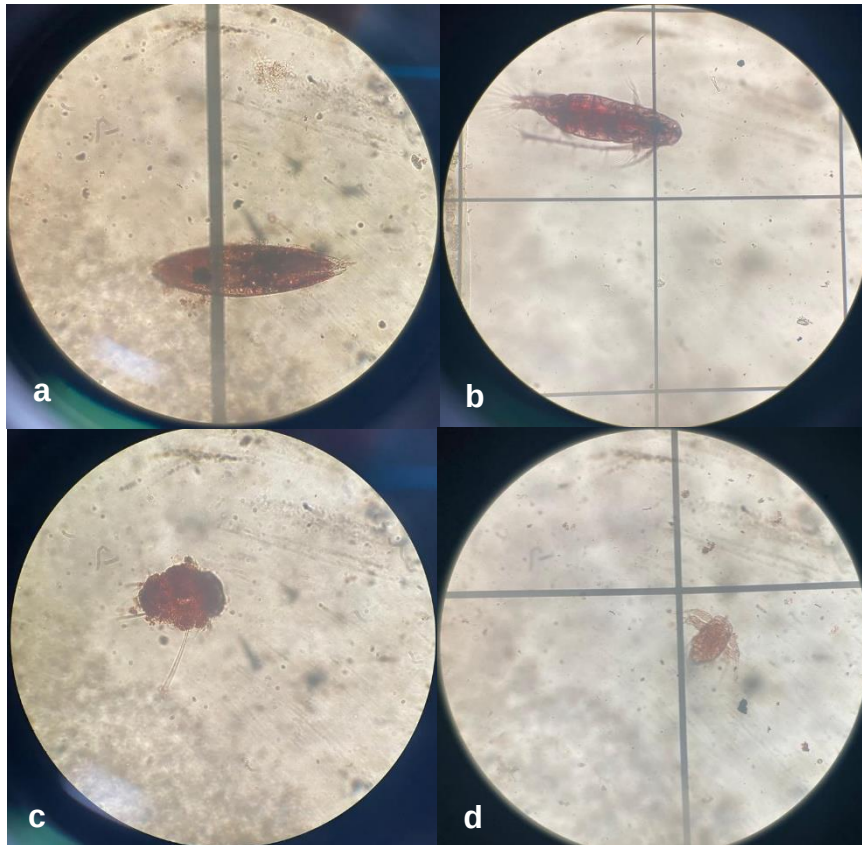


Figura 1. Organismos positivos a tinción con rojo neutro. (a) Molusco bivalvo, (b) Copépodo calanoideo, (c) Larva de poliqueto y (d) Nauplio de crustáceo.

Sin embargo, no todos los grupos de organismos mostraron la misma afinidad con el colorante. Por ejemplo, los tintínidos de los géneros *Leprotintinnus* y *Favella*, cuya lórica tiende a ser hialina, presentaron una ligera coloración en esta estructura externa cuando no había célula en el interior o no estaba viva. Cuando hay célula en el interior y está viva, se observa mayor absorción del colorante por el organismo en si (Fig. 2). Del mismo modo, dentro del mismo grupo la coloración es diferencial. En el caso de los crustáceos, no todos los nauplios absorben el colorante de la misma manera.

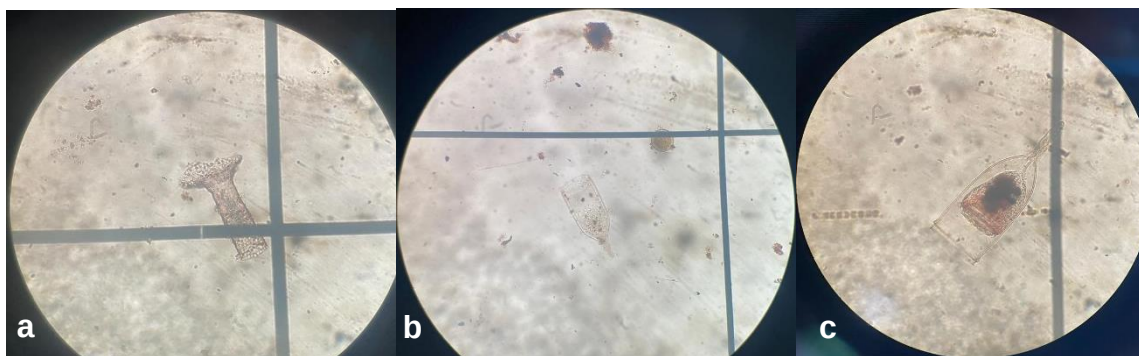


Figura 2. Absorción del rojo neutro en tintínidos de los géneros *Leprotintinnus* y *Favella*. (a) Lórica de *Leprotintinnus* ligeramente coloreada, (b) Lórica vacía de *Favella* sin teñir y (c) *Favella* con célula viva y coloreada.

3.1.2. Pruebas de seguimiento

Los resultados de este experimento se muestran en la Figura 3. En la mayoría de los organismos se observó pérdida de la coloración rosada o rojiza y en cambio, apareció una coloración marrón. No obstante, algunos nauplios y copépodos conservaron su coloración original, por lo que parece existir variación entre especímenes. En este sentido, se generan dos recomendaciones: la primera es que no de añadir preservante a las muestras, estas deben analizarse antes de

transcurridos cinco días de su colecta o de lo contrario puede dificultarse la asignación de los organismos a la categoría de vivo o muerto y la segunda, la mejor opción es añadir un preservante para mantener la tinción por un periodo de tiempo mayor.

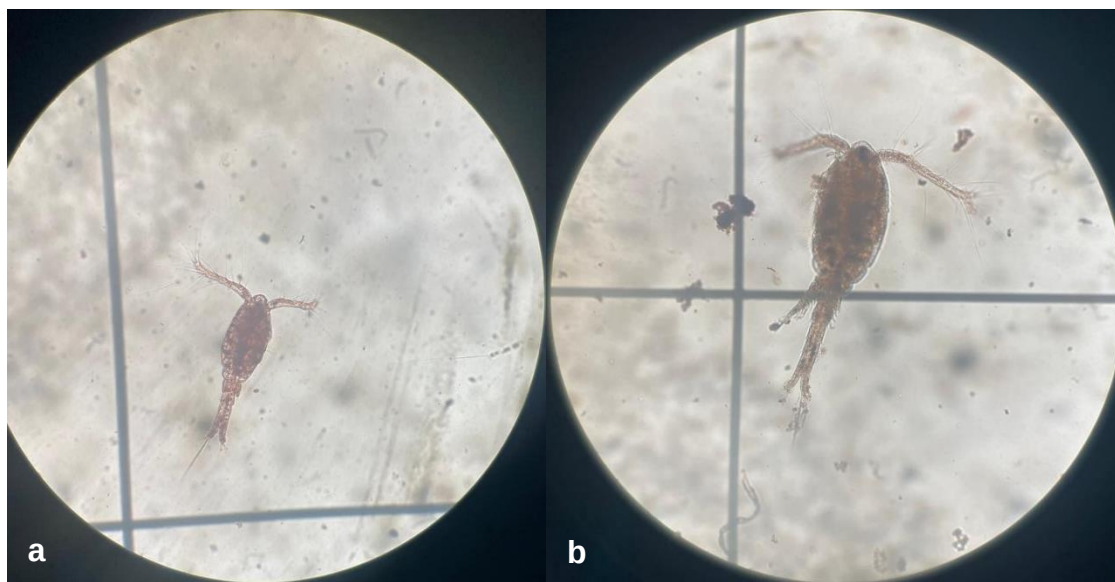


Figura 3. Pérdida de coloración transcurridos cinco días de la adición de rojo neutro sin añadir preservante. (a) Copépodo oithonido día 1 con coloración rosada y (b) copépodo oithonido día 5 con coloración marrón.

3.1.3. Experimento prueba de pérdida de organismos

En la Tabla 1 se muestran los resultados obtenidos en las lecturas originales y las lecturas post tamizado. Se evidencian porcentajes nulos de pérdida en cuatro de las pruebas, mientras que en las demás, la pérdida de organismos osciló entre el 12.5 y el 50 %. La prueba de signos de Wilcoxon no evidenció diferencias significativas entre las lecturas originales y las lecturas post tamizado ($p = 0.25$; suma de rangos = 6). Sin embargo, pérdidas del 50 % de organismos pueden convertirse en un inconveniente para la confiabilidad del método pues en buques con concentraciones de organismos ligeramente mayores a la descarga permitida (por ejemplo, 20

Org/m³) una pérdida del 50 % de los organismos en el proceso de tamizado puede representar la diferencia entre el incumplimiento y el cumplimiento. Se recomienda entonces, aplicar preservante para poder incluir otros grupos (nauplios y copépodos) en los conteos sin riesgo de que los organismos se degraden entre un conteo y otro. Adicionalmente, pese a que es un proceso dispendioso, contar con las observaciones de otra analista sería valioso.

Tabla 1. Lecturas de un solo analista (A1) para el blanco enriquecido sin tamizar y post tamizado.				
Prueba	Organismo	Tratamiento		% Pérdida
		Sin tamizar	Post tamizado	
P1	<i>Leprotintinnus</i>	12	10	33.3
	<i>Favella</i>	3	0	
	Total	15	10	
P2	<i>Leprotintinnus</i>	1	1	0
	<i>Favella</i>	1	1	
	Total	2	2	
P3	<i>Leprotintinnus</i>	0	0	0
	<i>Favella</i>	1	1	
	Total	1	1	
P4	<i>Leprotintinnus</i>	6	6	12.5
	<i>Favella</i>	2	1	
	Total	8	7	
P5	<i>Leprotintinnus</i>	1	1	0
	<i>Favella</i>	0	0	
	Total	1	1	
P6	<i>Leprotintinnus</i>	1	1	50
	<i>Favella</i>	1	0	
	Total	2	1	
P7	<i>Leprotintinnus</i>	1	1	0
	<i>Favella</i>	1	1	
	Total	2	2	

3.2. Aseguramiento de la calidad

3.2.1. Blanco muestra

Tras la realización del triple filtrado indicado en la metodología, las lecturas de los blancos sin preservante y con preservante dieron todos valores de 0. Si bien es ideal que no se identifique presencia de organismos en los blancos, este hecho

imposibilita la aplicación de las ecuaciones 2 y 3. Por lo anterior el cálculo del límite de detección y cuantificación del método será abordado a profundidad en la discusión.

Además, es importante mencionar que cuatro días después del montaje de los blancos, las réplicas del tratamiento sin preservante comenzaron a mostrar la formación de aglomeraciones; este comportamiento no fue observado en el tratamiento con adición de preservante. Tras revisar una alícuota de las aglomeraciones bajo el microscopio se pudo evidenciar que se trata de detritus y partículas que forman agregaciones (Fig. 4).

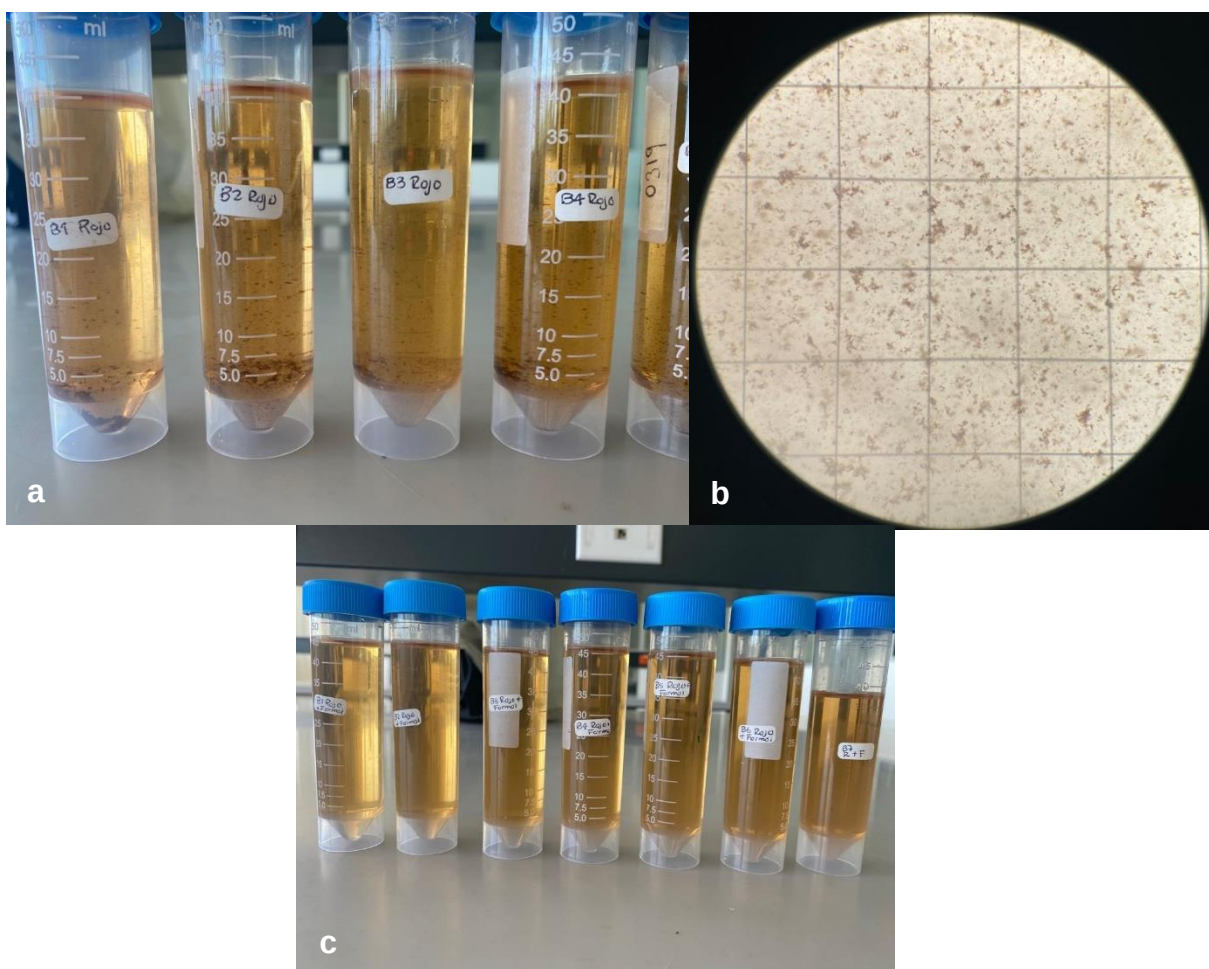


Figura 4. Comportamiento de blancos sin y con adición de preservante. (a) Blancos sin preservante con aglomeraciones, (b) observación microscópica de una alícuota de aglomeraciones y (c) blancos con adición de preservantes.

3.2.2. *Controles negativos*

Con la realización de este experimento no se evidenció ningún tipo de movilidad en los organismos. El resultado indica que ningún analista, en ninguna de las siete alícuotas analizadas, detectó presencia de organismos teñidos. Es importante recalcar que la aplicación de un tratamiento agresivo como lo es el sometimiento a temperaturas elevadas (110 °C) durante tres ciclos de 15 minutos por tres días, sumado al tiempo transcurrido sin presencia de oxígeno, parece ser suficiente para evitar la absorción del colorante por los organismos pues no se observó ningún tipo de coloración interna y los especímenes mostraron señales de daños corporales, como cuerpo notablemente más débil, con tendencia a la transparencia y ruptura del exoesqueleto en el caso de copépodos y nauplios (Fig. 5).

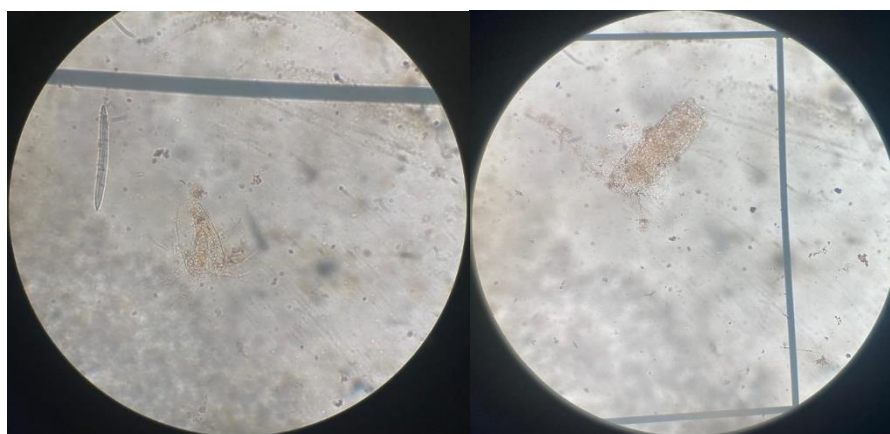


Figura 5. Organismos observados en los controles negativos. (a) nauplio y (b) copépodo.

3.2.3. *Controles positivos*

Los organismos seleccionados para cada uno de los controles positivos son mostrados en la Tabla 2. En todos los casos se pudo verificar la viabilidad tanto por movilidad como por tinción con rojo neutro.

Tabla 2. Organismos considerados en cada control positivo analizado			
Control	Inóculo de organismos	Tinción	Movimiento
C1	01 larva de poliqueto 01 copépodo calanoideo 01 nauplio	+	+
C2	01 copépodo calanoideo 01 nauplio	+	+
C3	01 copépodo oithonido 02 nauplios	+	+
C4	01 copépodo oithonido 02 nauplios 01 larva de poliqueto	+	+
C5	01 copépodo calanoideo 01 nauplio	+	+
C6	01 copépodo oithonido 03 nauplios	+	+
C7	01 copépodo oithonido 01 nauplio 02 <i>Favella</i> con célula	+	+
Total	22 organismos		

3.3. Muestras de matriz de agua de lastre

Los resultados de los conteos de organismos en esta matriz son mostrados en la Tabla 3. Las muestras en las que los dos analistas revisaron la misma alícuota se trataron como muestras dependientes, mientras que las lecturas de alícuotas diferentes se nombran como muestras independientes. A pesar de contar con

sistema de tratamiento a bordo, la cuantificación realizada indicaría que el buque monitoreado no cumplía con el límite de descarga establecido por la D2 pues en promedio cuenta con entre 22 y 67 organismos viables por m³. Se observó que tanto la desviación estándar como el coeficiente de variación fueron altos en los dos tipos de lectura con valores de hasta ± 67 Org/m³ y 219 % respectivamente. Pese a que las cifras disminuyen (± 22 Org/m³ y 140 %) en el tratamiento dependiente, continúan siendo demasiado elevadas. Cabe resaltar que, pese a las variaciones entre analistas, ambos resultados coinciden en indicar que el buque no cumple lo indicado en la directriz.

Tabla 3. Resultados de lecturas de muestras en dos días considerando alícuotas diferentes (MAL independientes) y la misma alícuota (MAL dependientes).

MAL Independientes			MAL Dependientes		
	D1	D2		D1	D2
	0	0		0	48
	48	48		0	0
	0	0		40	0
A1	143	238	A1	48	238
	0	36		0	36
	0	0		0	0
	0	40		40	0
	0	0		0	48
	0	0		0	48
	0	0		40	0
A2	95	95	A2	48	143
	0	0		0	36
	0	0		0	48
	0	0		0	0
Promedio	20	33	Promedio	15	46
Desviación estándar	45	66	Desviación estándar	22	67
CV (%)	219	201	CV (%)	140	147

3.4.

Parámetros calculados

3.4.1. Límite de detección y límite de cuantificación

Como se mencionó en la sección 3.2.1 fue imposible aplicar la fórmula de límite de detección y límite de cuantificación (Ecs. 2 y 3) dada la obtención de valores de 0 en todos los experimentos con blancos. No obstante, reemplazando en la ecuación 4 se obtiene un límite de detección de 6.4 Org/m³.

$$LD = \frac{1 \text{ Org}}{0.053 \times 2.94}$$

$$LD = 6.4 \text{ Org/m}^3$$

3.4.2. Repetibilidad

La Tabla 3 muestra el promedio, desviación estándar y coeficiente de variación (CV) para cada uno de los tratamientos. En la Tabla 4 se resumen los resultados de los estadísticos de prueba (prueba no paramétrica de Wilcoxon). Según los datos, pese a que se observen valores altos de desviación estándar y del coeficiente de variación (Tabla 3), no se encontraron diferencias significativas entre días ni entre analistas en ninguno de los dos tratamientos (alícuotas independientes o alícuotas iguales).

Tabla 4. Comparaciones estadísticas (Pruebas de Wilcoxon) entre dos días y dos analistas para lecturas independientes y lecturas de la misma alícuota.

Entre días		
	Alícuotas diferentes	Alícuotas iguales
Diferencias significativas	0	0
Valor p	0.5261	0.1829
Suma de rangos	191.5	176
Entre analistas		
	Alícuotas diferentes	Alícuotas iguales*
Diferencias significativas	0	0
Valor p	0.1416	1

Diferencias significativas: 0 indica ausencia y 1 presencia.

* Tratadas como muestras dependientes.

Por otro lado, los dendrogramas de Bray-Curtis muestran una alta similitud entre las observaciones por día y analista (Fig. 6). Se observa para las lecturas de alícuotas independientes (Fig. 6a) que se forman agrupaciones por analistas con similitudes superiores al 75 %, indicando que el día de realización de la lectura no influencia el resultado. Al comparar los resultados obtenidos para las mismas alícuotas por dos analistas diferentes (Fig. 6b) se evidencian similitudes mayores al 85 %.

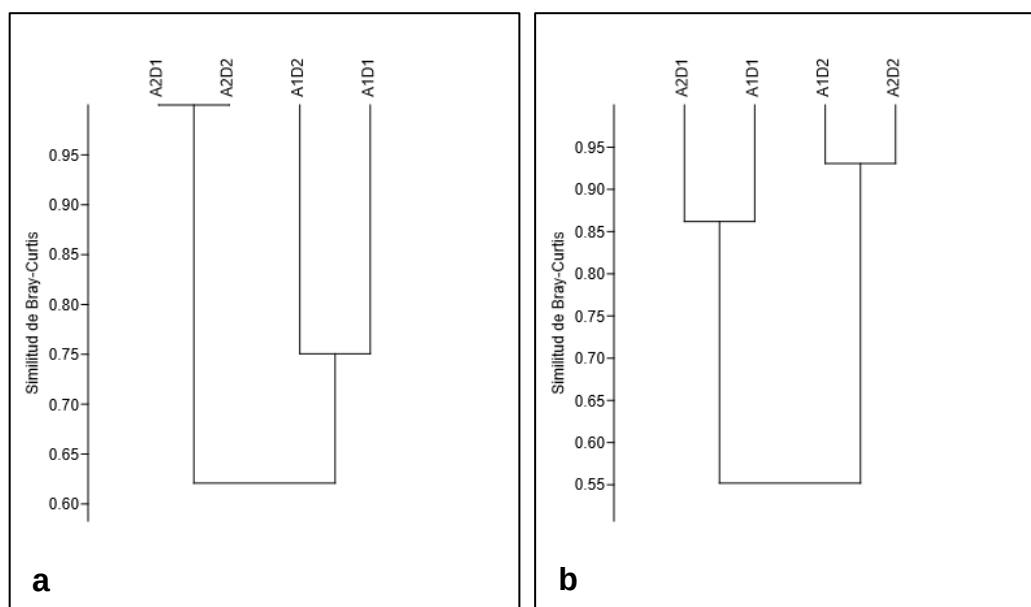


Figura 6. Dendrogramas de similitud de Bray-Curtis para lecturas de dos analistas en dos días diferentes. (a) Alícuotas independientes y (b) alícuotas iguales.

3.4.3. Recuperación

La Tabla 5 contiene el porcentaje de recuperación de cada una de las siete muestras revisadas por un único analista. Los valores oscilaron entre el 50 y 100 % y,

exceptuando por el límite inferior, se encuentran dentro del intervalo frecuentemente aceptado para otro tipo de análisis (85- 155 %).

Tabla 5. Porcentajes de recuperación obtenidos en siete muestras revisadas por un único analista.			
	Referencia (Sin tamizar)	Lectura (Post tamizado)	% Recuperación
A1	15	10	67
	2	2	100
	1	1	100
	8	7	88
	1	1	100
	2	1	50
	2	2	100

3.4.4. Incertidumbre

Los resultados del cálculo de la incertidumbre muestran una incertidumbre combinada de ± 5.421 y una incertidumbre expandida de ± 10.842 (Tabla 6).

Tabla 6. Cálculo de incertidumbre del método.						
Fuentes	Detalles y unidades	Valor reportado de error o incertidumbre	Distribución estadística	Incertidumbre estándar por componente	Incertidumbre combinada	Incertidumbre expandida
Equipos	Transferpipeta	0.72	Normal	0.321993789	5.421	10.842
	Balanza	0.00006		2.68328E-05		
	Congelador	1.1		0.491934955		
	Nevera	1.1		0.491934955		
Precisión	*	12		5.366563146		

* Calculada con base a los datos reportados en repetibilidad de una muestra de agua de lastre tratada.

3.4.5. Tasa de falsos negativos

Reemplazando los datos en la Ec. 7, se obtiene lo siguiente:

$$TFN = \left[1 - \frac{(22)}{(22 + 0)} \right]$$

Donde 22 corresponden al total de organismos incluidos en el control positivo (Tabla 2) y a los organismos que presentaron alguna coloración en el control negativo. El valor calculado para la *TFN* es de **0**.

3.4.6. Tasa de falsos positivos

De la aplicación de la Ec. 8 se obtiene una *TFP* de **0.0052**. Los datos reemplazados en la ecuación son *VN* (192 organismos contados en los 7 controles negativos) y *FP* (un organismo).

4. DISCUSIÓN

4.1. Pruebas de tinción

De manera general, los resultados obtenidos respecto a la capacidad de tinción del rojo neutro fueron buenos tanto en muestras sin preservar como en muestras preservadas. Grupos como los copépodos, poliquetos, moluscos, rotíferos, apendicularios y quetognatos mostraron una buena absorción del colorante (Fig. 1). Para los copépodos, la respuesta fue buena tanto en adultos como en estadios larvales. Lo mencionado coincide con los hallazgos de Crippen y Perrier (1974) quienes 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.

Sin embargo, algunos grupos de organismos presentaron inconvenientes con la tinción. Tal es el caso de las larvas cypris de crustáceos las cuales no tiñen pese a

incrementar la concentración del colorante en la muestra; únicamente se observa concentración en las coxas o articulaciones de los apéndices (Ver informe 2022). Este mismo inconveniente fue experimentado por Zetsche y Meysman (2012) quienes además tuvieron dificultades en la tinción de mysidos. Elliott y Tang (2009) señalan una tinción restringida a las articulaciones para balanos en muestras preservadas.

Otros grupos, no siempre mostraron una absorción completa del rojo neutral en sus cuerpos, tal es el caso de los moluscos (Zetsche y Meysman, 2012) y de los tintínidos de lórica hialina (Fig. 2). En el caso de este último grupo, en ocasiones se tiñe la lórica y no la célula o viceversa.

Un hallazgo importante de los experimentos realizados es el tiempo de utilidad de la solución stock de rojo neutro, la cual bajo condiciones adecuadas de refrigeración (aproximadamente 4 °C) conserva su capacidad de tinción un año después de su preparación. En cuanto a la permanencia de la tinción en las muestras, la literatura habla de alrededor de 28 semanas tras la adición de formaldehído como preservante (Fleming y Coughlan, 1978). La preservación de las muestras teñidas reviste crucial importancia, sobre todo cuando el arribo de las muestras al laboratorio se dificulta, pues se evidenció pérdida de la coloración rojiza o rosada en muestras sin preservar tan solo cinco días después de la colecta (Fig. 3).

4.2. Parámetros a calcular

En cuanto a la parte cuantitativa del método, con un adecuado proceso de triple filtrado se logró garantizar la ausencia de organismos en los blancos. La obtención de valores de 0 imposibilitó la aplicación de ecuaciones empleadas en otros

métodos analíticos (Ecs. 2 y 3). Sin embargo, teniendo en cuenta la naturaleza del mesurando (organismos planctónicos), se plantea 1 como el mínimo de organismos, estadios larvales u estructuras de resistencia que el ojo de cualquier analista puede detectar. Partiendo de esta premisa, la implementación de la ecuación 4 arroja un límite de detección de 6.4 Org/m^3 , valor satisfactorio pues se encuentra por debajo del límite de descarga permitido por la regla D2 de la OMI ($< 10 \text{ Org viables/m}^3$). Para reducir este límite, se recomienda o bien contar una fracción mayor de la muestra o coleccionar muestras de un mayor volumen y contar una fracción pequeña (First y Drake, 2012).

De manera general, el análisis de aguas de lastre requiere de un alto grado de precisión y exactitud ya que elevadas variaciones entre replicas o entre conteos por diferentes analistas reduce la confiabilidad en las estimaciones de densidad de organismos (First y Drake, 2012). Los datos de desviación estándar mostrados en la Tabla 3 se consideran elevados y hacen alusión a su alta dispersión. En términos de calidad, entre menor sea la desviación estándar del conjunto de datos, mayor será su calidad. Sin embargo, los datos biológicos se comportan diferente a otro tipo de analitos y para el caso específico del plancton, se ha demostrado alta variabilidad dentro de una muestra, especialmente para los grupos menos frecuentes (Mack et al., 2012). Del mismo modo estos autores demostraron que existen diferencias estadísticas entre los métodos de conteo (50, 100, 150 o 200 organismos del más abundante). En este orden de ideas, la aplicación de pruebas no paramétricas (Wilcoxon) y análisis ecológicos (Bray-Curtis) para determinar la similitud entre los resultados cuantitativos obtenidos puso de manifiesto que los estadísticos

inferenciales empleados usualmente en la validación de métodos (por ejemplo, desviación estándar, coeficiente de variación) no son útiles en el caso de analitos biológicos. Los resultados de similitud obtenidos (Fig. 6) podrían variar según la experiencia de los analistas (First y Drake, 2012) en observación de plancton tanto sin tinción como con tinción. Para profundizar en el error asociado a la cuantificación de organismos, generalmente se acepta un error de $\pm 20\%$. Bajo el supuesto de que los organismos están distribuidos al azar siguiendo una distribución de Poisson, la precisión y el error dependen del número de especímenes contados. Como regla, entre mayor sea el número de organismos contados la precisión será mayor y el error será menor (Postel *et al.*, 2000). Por ejemplo, el conteo de 100 organismos del taxón más abundante se asocia a una precisión de $\pm 20\%$ y el rango de organismos oscilará entre 80 y 120. Sin embargo, se esperaría que la cantidad de organismos en una matriz de agua de lastre tratada sea baja, de manera que el número de organismos contados será limitado, la precisión disminuirá y el error incrementará.

Respecto a los controles positivos y negativos, Cullen y MacIntyre (2016) mencionan la “regla de los cinco”, la cual consiste en que se requieren cinco mediciones consecutivas para declarar falsos negativos, pero tan solo una para los falsos positivos; lo anterior en pro de la protección del ambiente marino. Al igual que en este estudio, Steinberg y colaboradores en 2011 calcularon las tasas de falsos negativos y positivos, considerando la movilidad como criterio confirmatorio de viabilidad. Los resultados obtenidos por estos autores concuerdan con lo presentado en las secciones 3.4.5 y 3.4.6 con tasas bajas. Sin embargo, Cullen (2018) enfatiza en que asumir que todos los organismos vivos poseen movilidad es

erróneo y debe confirmarse la funcionalidad de un organismo a través de otro criterio. En este sentido, pese a que el cálculo de las tasas de falsos negativos y falsos positivos arrojó valores bajos, sería ideal trabajar los controles tanto negativos como positivos, con un organismo modelo y/o proveniente de un cultivo de referencia certificado.

En lo concerniente al parámetro de recuperación, los porcentajes fueron variables (Tabla 5) pero se mantuvieron cercanos al intervalo aceptado para otros métodos analíticos. Para mejorar la estimación de este parámetro se recomienda la inclusión de otra técnica de cuantificación que funcione como valor de referencia (por ejemplo, citometría de flujo) o trabajar con material no vivo como microesferas (First y Drake, 2012). La realización de este experimento es de gran importancia puesto que el proceso de concentración de la muestra reduce los tiempos de análisis y facilita el conteo de una fracción más grande de la muestra.

Para finalizar, es importante discutir la incertidumbre. Esta propuesta metodológica se trabajó asumiendo que el muestreo fue representativo de la comunidad zooplanctónica presente en los tanques de lastre monitoreados. Bajo esta consideración se obtuvo una incertidumbre que no puede considerarse baja, cuya fuente principal es el componente asociado a la precisión del método (Tabla 6), por lo que mejorando el proceso de cuantificación se esperaría disminuir notablemente la incertidumbre, y de este modo, mejorar la calidad del método. No obstante, debe considerarse a futuro la evaluación de la incertidumbre asociada al método de muestreo y si realmente se obtienen muestras representativas de los buques a

evaluar ya que algunos parámetros necesarios para la validación del método están sujetos al volumen de agua filtrado (por ejemplo, el límite de detección).

5. CONCLUSIONES

El colorante rojo neutro demostró ser una alternativa útil en la evaluación del estado de viabilidad de organismos pertenecientes a la fracción $\geq 50 \mu\text{m}$ al ser aplicable a un buen número de grupos taxonómicos presentes en aguas de lastre y conservar su funcionalidad por periodos prolongados de tiempo (un año).

Existen comportamientos diferenciales en la absorción de la tinción, por lo que puede decirse que el colorante es selectivo. Dicha selectividad debe ser evaluada especialmente para organismos como moluscos, tintínidos y larvas de crustáceos cuyas observaciones deben tratarse con especial cuidado.

La adición de preservante evita la aglomeración de rojo neutro y retiene la coloración de los organismos por mas tiempo. Muestras sin adición de preservante evidencian perdida de tinción alrededor de cinco días después de la colecta.

Respecto al aseguramiento de la calidad, la triple filtración del agua de mar eliminó organismos del tamaño de interés por lo cual puede emplearse de manera segura para los blancos. El proceso de calentamiento a temperatura elevadas en diferentes ciclos y días arrojó tasas de falsos positivos muy bajas.

Los resultados obtenidos para el componente cuantitativo del método fueron satisfactorios, con un límite de detección inferior al límite de descarga permitido por la OMI, ausencia de diferencias significativas entre días y analistas y valores de recuperación superiores al 50 %.

6. RECOMENDACIONES

Al momento de analizar una muestra teñida con rojo neutro y no observar coloración rojiza o rosa, se recomienda aumentar la cantidad de luz y verificar la presencia de tinción a un objetivo de mayor aumento. Se considera 10X como el mínimo aumento para la observación de organismos teñidos. Ante cualquier duda respecto a la identificación del organismo lo ideal es revisar a una mayor magnificación.

Los resultados cuantitativos pueden optimizarse. El límite de cuantificación puede reducirse colectando un mayor volumen de muestra (volumen filtrado) o analizando una fracción mas grande de la misma. El porcentaje de recuperación se puede trabajar con muestras preservadas o con microesferas sintéticas.

Para evaluar la robustez del método se recomienda la comparación con otro colorante vital o con otra técnica de cuantificación como, por ejemplo, la citometría de flujo.

En cuanto a los controles de calidad, debe incluirse el trabajo con cultivos certificados de organismos para los controles positivos.

7. BIBLIOGRAFÍA

Adams, J.K., Briski, E., Ram, J.L. y Bailey, S.A. 2014. Evaluating the response of freshwater organisms to vital staining. *Management of Biological Invasions* 5(3), 197–208.

Austero, N. M. 2019. Viability of Phytoplankton from Ballast Waters of International Vessels Berthing at Ports of Cebu and Subic Bay, Philippines. *Science Diliman*, 31, 69–78.

Brussaard, C. P. D., Marie, D., Thyrrhaug, R. y Bratbak, G. 2001. Flow cytometric analysis of phytoplankton viability following viral infection. *Aquatic Microbiology and Ecology*, 26, 157–166.

Crippen, R. W. y Perrier, J. L .1974. The use of neutral red and Evans's blue for live-dead determinations of marine plankton (with comments on the use of rotenone for inhibition of grazing). *Biotechnic and Histochemistry*, 49, 97–104.

Cullen, J. 2018. Quantitative framework for validating two methodologies that are used to enumerate viable organisms for type approval of ballast water management systems. *Science of the Total Environment* 627, 1602–1626.

Cullen, J.J. y MacIntyre, H.L. 2016. On the use of the serial dilution culture method to enumerate viable phytoplankton in natural communities of plankton subjected to ballast water treatment. *Journal of Applied Phycology* 28, 279–298.

Ellison, S.L.R., Rosslein, M., y Williams, A. 2012. EURACHEM/CITAC Guide CG 4, “Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement”, Third Edition.

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>

Fleming, J.M. y Coughlan, J. 1978. Preservation of Vially Stained Zooplankton for Live/Dead Sorting. *Estuaries* 1(2), 135-137.

Kang, J. H., Hyun, B.G y Shin, K .2010. Phytoplankton viability in ballast water from international commercial ships berthed at ports in Korea. *Marine Pollution Bulletin*, 60, 230–237.

Mack, H. R., Conroy, J. D., Blocksom, K. A., Stein, R. A. y Ludsin, S. A. 2012. A comparative analysis of zooplankton field collection and sample enumeration methods. *Limnology and Oceanography: Methods*, 10 (1), 41–53. doi:10.4319/lom.2012.10.41

Postel, L., Fock H., y Hagen, W. 2000. Biomass and abundance. En: Harris, R., Wiebe, P., Lenz, J., Skjoldal, R., y Huntley, M. (Editors). ICES zooplankton methodology manual. Reino Unido, Academic Press, pp.83-192.

Steinberg, M.K., Lemieux, E.J. y Drake, L.A. 2011. Determining the viability of marine protists using a combination of vital, fluorescent stains. *Marine Biology* 158, 1431–1437.

Steinberg, M. K., First, M.R., Lemieux, E.J., Drake, L.A., Nelson, B.N., Kulis, D.M., Anderson, D.M., Welschmeyer, N.A., y Herring, P.R. 2012. Comparison of techniques used to count single-celled viable phytoplankton. *Journal of Applied Phycology*. 24, 751–758.

Yáñez, S., Hidalgo, P. y Tang, K.W. 2019. Relative importance of predatory versus non-predatory mortality for dominant copepod species in the northern Chilean (23°S) Humboldt Current System. *Marine Ecology Progress Series* 630, 13–23.

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