

**VALIDACIÓN DEL MÉTODO BIOLÓGICO PARA LA DETERMINACIÓN DE VIABILIDAD DE
ORGANISMOS FITOPLANCTÓNICOS EN AGUAS DE LASTRE**

**Uso de Diacetato de Fluoresceína (FDA) para evaluar la viabilidad del fitoplancton en
aguas de lastre a través de la técnica de citometría de flujo**

INFORME TÉCNICO FINAL

SECCIÓN PROTECCIÓN DEL MEDIO MARINO
SECCIÓN LABORATORIO -SEDE CARIBE
CENTRO DE INVESTIGACIONES OCEANOGRÁFICAS E
HIDROGRÁFICAS DEL CARIBE CARTAGENA, COLOMBIA
ABRIL, 2024.

En este documento se recopilan los procesos 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, en el marco del proyecto de investigación “Producir información técnica-científica para PMM en Áreas Marinas y Zonas Portuarias” ejecutado por la Sección de Protección del Medio Marino del CIOH.

Tabla de contenido

INTRODUCCIÓN	4
METODOLOGÍA.....	5
EQUIPAMIENTO REQUERIDO POR EL MÉTODO: FLOWCAM	5
EQUIPOS, INSTRUMENTOS Y MATERIALES EMPLEADOS	7
REACTIVOS Y MATERIAL DE REFERENCIA (PATRONES, MR Y MRC)	8
CONTEXTO	8
CONSIDERACIONES SOBRE EL EQUIPAMIENTO FLOWCAM VS4.....	9
RESULTADOS DE LOS PARÁMETROS DE VALIDACIÓN	10
1. CRITERIO DE VIABILIDAD	10
2. LÍMITES DE DETECCIÓN (LD) Y CUANTIFICACIÓN (LC)	12
3. PRUEBA DE RENDIMIENTO	14
4. LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN (LOQ).....	16
5. LÍMITE SUPERIOR DE CUANTIFICACIÓN	18
6. PRECISIÓN.....	19
7. PORCENTAJE DE RECUPERACIÓN	24
8. INCERTIDUMBRE	26
CONCLUSIONES	29
BIBLIOGRAFÍA.....	29

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 fisicoquímicas, 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), considerando 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).

METODOLOGÍA

EQUIPAMIENTO REQUERIDO POR EL MÉTODO: 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 microscopia 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 de Determinación de Viabilidad de Organismos Fitoplanctónicos Mediante Citometría de Flujo.

Nombre	Fabricante	Modelo	Serie	Certificado de Calibración, Calificación y/o Mantenimiento		Incertidumbre
				Fecha	Número	
Balanza	OHAUS	DV215CD	DV215CD	02/05/2022	C2598-22	±0.00006 g
Bomba de vacío	Vacuubrand	ME 1C	ME 1C	12/08/2021	2355	N/A
Nevera- Congelador	LG	GR50G31CVF	204KR00232	24/07/2019	CLT 324419	±0,07200°C
Balón aforado 20 mL CIA	Brand	Duran	N/A	20/07/2020	37259	±0.0129 mL
Pipeta aforada de 3 mL CIA	Brand	Duran	N/A	8/08/2014	29705	±0.0021 mL
Probeta de 500 mL Clase A	Schott	Duran	N/A	N/A	N/A	±10 mL
Matraz kitasato	SCHOTT	DURAN	N/A	N/A	N/A	N/A
Pinzas planas con punta	N/A	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	N/A
Papel aluminio	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
Papel de arroz	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
Mallas 10 µm	Fluid Imaging Technologies	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
Mallas 50 µm	Fluid Imaging Technologies	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
Celda de flujo de 100µm x 1 mm	Fluid Imaging Technologies	FC100X1	N/A	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 fitoplanctónicos 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 de menos costo (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
Diacetato de Fluoresceína (FDA)	F7378-5G	MKCM9758	07/2024	25 mg	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 determinar la viabilidad de organismos en el laboratorio del Centro de Investigaciones Oceanográficas e Hidrográficas del Caribe se realizó en las áreas de Biología y Microbiología, concentrándose principalmente en las zonas 10 y 15. Se consideraron cuatro tipos de matrices: 1) Agua de Mar Sintética, 2) Agua Estuarina (Sistema Eutrófico), 3) Agua de Lastre sin tratamiento y 4) Agua de Lastre con tratamiento (Filtración + UV).

El criterio de viabilidad se definió mediante el Límite Crítico, determinado por la longitud de onda emitida por las fibras de fluorescencia. Para este fin, se utilizaron muestras de Agua de Mar Sintética. Al mezclar el Diacetato de Fluoresceína (FDA) con una muestra natural o similar, se genera la formación de fibras de fluoresceína que, al ser estimuladas por una fuente de energía adecuada, emiten luz a una longitud de onda específica. Esta luz es detectada y cuantificada utilizando un citómetro de flujo.

Asimismo, se emplearon muestras de Agua Estuarina y Agua de Lastre (con y sin tratamiento) para calcular el Límite de Detección, la Prueba de Rendimiento, el Límite de Cuantificación, el Límite Superior de Cuantificación, así como para evaluar la Repetibilidad, Precisión Intermedia y el Porcentaje de Recuperación del método.

Se llevaron a cabo siete réplicas para cada parámetro analítico, con la colaboración de dos analistas durante dos o tres jornadas para calcular el Nivel Crítico y el Límite de Detección, y en una jornada única para la Prueba de Rendimiento, Límite de Cuantificación, Límite Superior de Cuantificación, y la evaluación de los parámetros de Repetibilidad, Precisión Intermedia y Porcentaje de

Recuperación. A continuación, se proporciona una lista de las siglas utilizadas en este ejercicio de validación:

A1: Analista 1 (Luis De La Hoz Barrientos)

A2: Analista 2 (Tatiana Marín Amado)

FDA: Diacetato de Fluoresceína

BCO: Blanco

BFL: Blanco Fortificado de Laboratorio

MN: Muestra de Agua Natural Estuarina (Sistema Eutrofizado)

MALCT: Muestra de Agua de Lastre con tratamiento (Filtración + UV)

MALST: Muestra de Agua de Lastre sin tratamiento

Es importante destacar que la ejecución de los ensayos implica la preparación de soluciones específicas para la determinación del analito. A continuación, se detalla el procedimiento para la preparación de estas soluciones:

Solución Stock de FDA: Para preparar una concentración de 5 mg/mL, disolver 25 mg de FDA en un balón aforado de 5 mL y agregar Dimetil Sulfóxido (DMSO) hasta la marca. Cubrir el balón con papel de aluminio para protegerlo de la luz y almacenarlo a 4°C o menos. Antes de usar, verificar que no haya cambios en la coloración.

Solución de Trabajo de FDA: Diluir la solución stock 400 veces con agua Milli-Q o agua destilada. Al igual que la solución stock, se debe verificar su coloración antes de usar.

Preparación de la Muestra: Añadir 25 µL de la solución de trabajo de FDA en 1 mL de muestra filtrada a través de mallas de 10 y 50 µm. Mantener las muestras teñidas a temperatura ambiente y en oscuridad durante al menos 15 minutos antes de la lectura. Las muestras pueden permanecer teñidas en la oscuridad hasta 45 minutos sin riesgo de degradación fluorescente, según se ha confirmado mediante recuentos repetidos.

Agua de Mar Sintética: Para su preparación, disolver 25 g de cloruro de sodio (NaCl) y 8 g de sulfato de magnesio heptahidratado (MgSO₄·7H₂O) en agua desionizada y completar hasta 1000 mL en un balón aforado.

CONSIDERACIONES SOBRE EL EQUIPAMIENTO FLOWCAM VS4

Es importante mencionar que la falta de mantenimiento y calibración del equipo FlowCAM VS4 desde su adquisición plantea serias preocupaciones sobre la precisión y fiabilidad de los resultados. El mantenimiento regular y la calibración son esenciales para asegurar el correcto funcionamiento del instrumento y la obtención de mediciones precisas.

La ausencia de mantenimiento puede resultar en el desgaste de componentes internos, afectando su rendimiento. Por ejemplo, se ha observado que el láser puede sobrecalentarse después de 4-5 horas de uso, interrumpiendo su funcionamiento temporalmente. Los láseres cuentan con sistemas de protección térmica que los apagan automáticamente al alcanzar temperaturas críticas, por lo que su revisión es esencial para prevenir daños y prolongar su vida útil.

La falta de calibración regular significa que la precisión del instrumento no ha sido verificada, lo que puede dar lugar a errores sistemáticos en las mediciones y, en consecuencia, a interpretaciones incorrectas de los datos.

Además, el uso de esferas de fluorescencia es fundamental en la citometría de flujo, ya que permiten evaluar el desempeño del equipo y asegurar la fiabilidad de los resultados. Estas esferas, recubiertas con fluorocromos que emiten diferentes longitudes de onda, son cruciales para calibrar el instrumento. Por ello, se sugiere considerar su adquisición para el año 2025, siendo suministradas por Fluid Imaging Technologies.

RESULTADOS DE LOS PARÁMETROS DE VALIDACIÓN

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

1. CRITERIO DE VIABILIDAD

El FDA (Diacetato de fluoresceína) es un colorante que se utiliza comúnmente en biología celular y molecular para identificar células vivas y evaluar la viabilidad celular. Cuando el FDA se mezcla con una muestra natural, como una muestra biológica o una muestra ambiental se genera una formación de fibras de fluoresceína (Fig. 1), lo cual, en ciertas condiciones, como un pH específico o la presencia de ciertos iones metálicos, la fluoresceína puede formar fibras o agregados. Estos agregados pueden ser el resultado de interacciones entre las moléculas de fluoresceína y otros componentes celulares, como proteínas o lípidos.

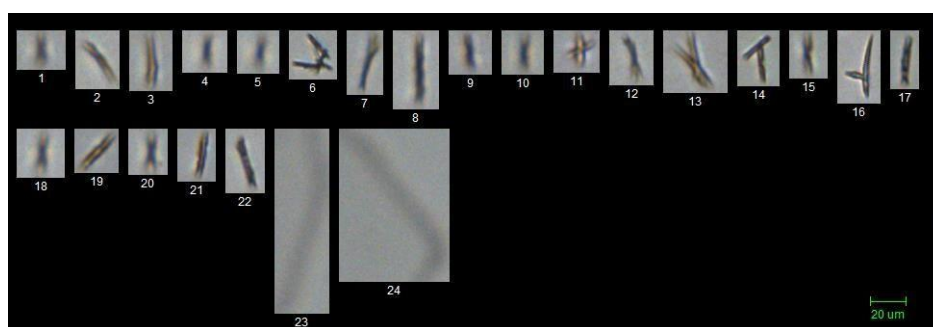


Figura 1. Imágenes de ejemplo de precipitados FDA registrados en las muestras de agua de mar sintética (Blancos) para el cálculo de los límites de detección y cuantificación.

Cuando estas fibras o agregados se forman, pueden exhibir propiedades de fluorescencia, emitiendo luz a una longitud de onda específica cuando son excitadas por una fuente de energía adecuada, siendo detectadas y cuantificadas, generando interferencia en un citómetro de flujo.

En la presente validación se ha considerado el efecto de las fibras producidas por la mezcla de agua de mar sintética y FDA en la fluorescencia emitida para calcular el Nivel Crítico, utilizando los valores de fluorescencia obtenidos durante tres días de desarrollo del ensayo.

Resultados:

Una vez analizados estos datos, se determinó un Nivel crítico basado en el cálculo de la suma de la señal media del blanco más un múltiplo K, que para este caso es de 0,674 (nivel de confianza del 50%) por la desviación estándar de la señal de blancos (APHA, 2023), obteniendo los siguientes resultados.

Tabla 4. Datos blancos (nm) para el cálculo del Nivel Crítico.

BLANCOS	D1		D2		D3	
	A1	A2	A1	A2	A1	A2
BCO 1	2016,0	2120,0	2176,0	2121,0	2047,0	2233,0
BCO 2	2115,0	2031,0	2289,0	2101,0	2116,0	2242,0
BCO 3	2008,0	2050,0	2166,0	2238,0	2213,0	2259,0
BCO 4	2296,0	2040,0	2236,0	2277,0	2045,0	2078,0
BCO 5	2180,0	2047,0	2291,0	2039,0	2196,0	2039,0
BCO 6	2020,0	2015,0	2271,0	2253,0	2229,0	2194,0
BCO 7	2039,0	2018,0	2056,0	2161,0	2030,0	2038,0

Para calcular el nivel crítico, se utilizó estadística descriptiva para analizar los datos recopilados durante estos tres días, calculando la media, la desviación estándar y otros estadísticos relevantes para entender la distribución de los valores de fluorescencia emitidos por las fibras en la mezcla.

Tabla 5. Nivel crítico como criterio para determinación de viabilidad en la validación del método

Promedio	2134,0
Desviación Estándar	97,9
Nivel Crítico	2200,0

Finalmente, se establecieron criterios específicos para definir la viabilidad de los organismos fitoplanctónicos durante la validación del método. Estos criterios se basan en los resultados obtenidos (Nivel Crítico), la Resolución 477 de 2012 y otros parámetros relevantes. A continuación, se detallan las aplicaciones de estos criterios:

- Inspección visual: Un analista con experiencia taxonómica revisará las imágenes obtenidas para asegurarse de que corresponden a organismos de la comunidad fitoplanctónica, garantizando que solo se cuenten las células pertinentes.
- Resolución 477 de 2012: Se verificará que las células identificadas se encuentren dentro del rango de tamaño establecido por la normativa, es decir, con un diámetro inferior a 50 micras y superior a 10 micras (ESD).
- Longitud de onda de emisión (nm): Se comprobará que la fluorescencia emitida por las partículas y/o células identificadas supere los 2200,0 nm, conforme al nivel crítico de fluorescencia definido.

La aplicación de estos criterios permitirá distinguir claramente entre los organismos fitoplanctónicos y otras partículas presentes en la muestra, como las fibras de FDA y la materia orgánica. Esto facilitará una determinación precisa de la viabilidad de los organismos fitoplanctónicos, asegurando resultados confiables en la validación del método.

A continuación, se presentan los parámetros evaluados en esta validación del método, junto con los valores obtenidos y los criterios de aceptación.

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

Límite de Detección (LOD):

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 (APHA, 2023)).

Resultados:

Para evaluar el límite de detección, se utilizaron blancos (BCO) sometidos al mismo procedimiento que las muestras. Estos blancos consistieron en 1 mL de agua de mar sintética, a los que se les aplicó la solución de trabajo de FDA. De este modo, se garantizó la validez de los resultados al comparar la fluorescencia obtenida en los blancos con la de las muestras analizadas.

Tabla 6. Datos blancos (partículas/mL) para el cálculo del Límite de Detección.

BLANCOS (partículas/mL)	D1		D2		D3	
	A1	A2	A1	A2	A1	A2
BCO 1	343	932	728	119	488	682
BCO 2	197	407	892	787	900	126
BCO 3	275	398	273	351	174	577
BCO 4	172	542	821	486	345	203
BCO 5	115	849	895	856	727	496
BCO 6	249	721	282	706	927	254
BCO 7	584	929	324	548	391	786

Al notar que el equipo contaba fibras y no el analito de interés, se procedió a realizar diluciones seriadas a partir de una muestra natural eutrofizada (BFL). El propósito principal de este proceso fue reducir la abundancia de organismos fitoplanctónicos viables a un nivel que permita la mínima enumeración precisa de organismos en una muestra y que sea detectada y cuantificada por el equipo.

Cada dilución en la serie se designó con un factor de dilución, que indicó cuántas veces se diluyó la muestra original en esa etapa específica. Por ejemplo, una dilución 1:10 significa que se tomó una parte de la muestra original y se agregaron 9 partes de solvente, luego, una parte de esta dilución se tomó y se agregó a una cantidad medida adicional de solvente, creando otra dilución. Este proceso se repitió tres veces, diluyendo la muestra original en una proporción de 1 parte de muestra original a 1000 partes de solvente. En términos de factor de dilución, esto se expresa como una

dilución de 1:1000, lo que permitió al equipo detectar de 1 a 2 células viables.

Se optó por realizar diluciones debido a la composición de la muestra natural. En muestras de agua eutrofizada, la alta concentración de materia orgánica dificulta la evaluación de la viabilidad de organismos fitoplanctónicos, lo que interfiere con el proceso de análisis y complica la interpretación de los resultados (Baek & Shin, 2009). Esto se debe a que la materia orgánica presente en este tipo de ecosistemas tiene la capacidad de fluorescer. Cuando la materia orgánica es excitada por la absorción de energía, algunos de sus electrones pueden ser elevados a niveles de energía más altos. Al regresar a sus estados de energía originales, estos electrones liberan la energía absorbida en forma de luz, lo que resulta en una emisión de luz a una longitud de onda específica (Lee et al., 2015). Por lo tanto, es necesario pretratar adecuadamente las muestras para minimizar la interferencia de la materia orgánica en el proceso de análisis.

Tabla 7. Datos blancos fortificados de laboratorio (BFL) (cel/mL) para el cálculo del Límite de Detección.

BFL (cel/mL)	D1		D2		D3	
	A1	A2	A1	A2	A1	A2
BFL1	1	1	2	1	1	1
BFL2	1	1	1	2	1	1
BFL3	1	2	1	1	1	1
BFL4	1	1	2	1	2	1
BFL5	1	1	2	1	1	2
BFL6	1	1	2	2	1	2
BFL7	2	2	2	2	1	1

El límite de detección se obtuvo leyendo la absorbancia de siete (07) BFL analizados en tres (02) días diferentes, por dos analistas (Tabla 4-5). Para el límite de detección, se calculó 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%.

Tabla 8. Límite de Detección para el método.

LÍMITES	VALOR OBTENIDO
Límite de Detección	2 cel/mL

En algunas circunstancias, el LOQ puede ser igual al LOD, pero esto depende de la sensibilidad y precisión del método de análisis utilizado. Si se demuestra con exactitud que el método de análisis es capaz de cuantificar con precisión concentraciones tan bajas como las que puede detectar (IUPAC, 1955; APHA, 2023).

Sin embargo, esto requiere una validación rigurosa del método de análisis, que implica la evaluación de parámetros como sensibilidad, especificidad, Tasa de falsos Positivos, Tasa de falsos Negativos, Eficiencia y selectividad del método, al que le denominaremos Prueba de Rendimiento (ISO 13843:2017). Si estos parámetros cumplen con los criterios aceptables para la cuantificación precisa en el rango de concentraciones del LOD, entonces se puede establecer que el LOQ es igual al LOD.

3. PRUEBA DE RENDIMIENTO

Una prueba de rendimiento en la validación de un método analítico es una evaluación sistemática que se lleva a cabo para determinar la capacidad del método para proporcionar resultados precisos y confiables de acuerdo con los requisitos establecidos (ISO 13843, 2017). La prueba de rendimiento de un método analítico involucra varios parámetros importantes que ayudan a evaluar su desempeño.

Sensibilidad

Descripción: La sensibilidad de un método analítico se refiere a su capacidad para detectar verdaderos positivos. En otras palabras, es la probabilidad de que el método produzca un resultado positivo cuando el analito está presente en la muestra. Se calcula dividiendo el número de verdaderos positivos entre la suma de los verdaderos positivos y los falsos negativos.

Especificidad

Descripción: La especificidad de un método analítico indica su capacidad para detectar verdaderos negativos. Es la probabilidad de que el método produzca un resultado negativo cuando el analito no está presente en la muestra. Se calcula dividiendo el número de verdaderos negativos entre la suma de los verdaderos negativos y los falsos positivos.

Eficiencia

Descripción: La eficiencia de un método analítico es una medida global de su desempeño y se calcula como la suma de los verdaderos positivos y los verdaderos negativos dividida entre el total de muestras probadas. En otras palabras, es la proporción de resultados correctos sobre el total de resultados.

Tasa de falsos positivos

Descripción: La tasa de falsos positivos es la proporción de resultados incorrectamente positivos entre todas las muestras que son negativas para el analito. Se calcula dividiendo el número de falsos positivos entre la suma de los verdaderos negativos y los falsos positivos.

Tasa de falsos negativos

Descripción: La tasa de falsos negativos es la proporción de resultados incorrectamente negativos entre todas las muestras que son positivas para el analito. Se calcula dividiendo el número de falsos negativos entre la suma de los verdaderos positivos y los falsos negativos.

Selectividad

Descripción: La selectividad de un método analítico se refiere a su capacidad para distinguir entre el analito de interés y otros componentes presentes en la muestra que podrían interferir con la medición. Es esencialmente la especificidad del método, pero puede incluir también la capacidad de discriminar entre el analito y compuestos estructuralmente similares.

Resultados:

Al igual que en el límite de detección, las muestras naturales fueron pretratadas de manera adecuada para minimizar la interferencia de la materia orgánica. Esto incluyó la realización de diluciones seriadas, por lo que en la prueba de rendimiento se trabajaron con muestras con una

dilución de 1:100, la cual fue enriquecida con células vivas (muestra original) y muertas (con sistema de tratamiento Filtración + UV), obteniendo los siguientes resultados.

Tabla 9. Resultados obtenidos a partir de las muestras enriquecida con células vivas y muertas.

MUESTRA NATURAL (MN) (cel/mL)	ANALISTA 1	ANALISTA 2
MN1	47	50
MN2	52	49
MN3	51	49
MN4	50	49
MN5	49	50
MN6	49	47
MN7	52	51
Total de partículas	350	345
Sometidas a verificación	243	237
Células confirmadas	147	159
Verdaderos positivos	212	231
Falsos positivos	138	114
Verdaderos negativos	138	114
Falsos negativos	0	0

Tabla 10. Tabla de contingencia. Resultados esperados vs resultados obtenidos.

Resultados esperados	Resultados obtenidos		
	Positivo (+)	Negativo (-)	
Presuntivo (+)	443	0	
Presuntivo (-)	252	252	443
	695	252	504
			947

Tabla 11. Pruebas de rendimiento de FDA para la determinación de viabilidad de organismos Fitoplanctónicos.

Sensibilidad	1,00
Especificidad	0,50
Eficiencia	0,73
Tasa de falsos positivos	0,36
Tasa de falsos negativos	0,00
Selectividad	0,47

En el caso de la validación de un método analítico realizado por dos analistas diferentes, la sensibilidad, la especificidad y demás características operacionales relacionadas a los parámetros no son medidas suficientes para desarrollar para determinar la exactitud y precisión de un método, por lo que es necesario realizar otras medidas como el Índice de Concordancia de Kappa el cual es utilizado para evaluar la concordancia entre los resultados obtenidos por dos analistas en un estudio

y así evaluar la validez y utilidad de un método analítico y ayudar a determinar su idoneidad para su aplicación en situaciones específicas (ISO 13843, 2017).

Índice de concordancia de kappa (κ)

Descripción: Es una medida estadística utilizada para evaluar la concordancia entre dos observadores o métodos de medición para variables categóricas (Cohen, 1968). La fórmula para el coeficiente kappa es la siguiente:

$$K = \frac{P_o - P_e}{1 - P_e}$$

Donde:

P_o es la proporción observada de acuerdo entre los observadores o métodos.

P_e es la proporción esperada de acuerdo que ocurriría por casualidad.

La proporción observada de acuerdo (P_o) se calcula como la suma de los acuerdos observados en las categorías de interés dividida por el número total de observaciones.

La proporción esperada de acuerdo (P_e) se calcula como la suma del producto de las proporciones marginales de cada categoría de los dos observadores o métodos.

Resultados:

El coeficiente kappa puede tener valores entre -1 y 1: Un valor de K cercano a 1 indica una concordancia casi perfecta, un valor de K cercano a 0 indica una concordancia similar a la esperada por casualidad y un valor de κ negativo indica una concordancia inferior a la esperada por casualidad.

Tabla 12. Índice de Concordancia de Kappa

Índice de Concordancia	0,61
po	0,734039208
pe	0,319716155
a+c	695
a+b	443
b+d	252
n	947
n ²	896460,365

4. LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN (LOQ)

Límite de Cuantificación (LOQ):

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 (APHA, 2023).

Resultados:

Como se mencionó anteriormente, El LOQ y el LOD pueden ser iguales, dependiendo de la sensibilidad y precisión del método analítico. Para que sean iguales, el método debe demostrar la capacidad de contar con precisión concentraciones muy bajas y detectarlas. Esto requiere una validación rigurosa, incluyendo la evaluación de parámetros como los evaluados en la prueba de rendimiento.

Los valores aceptados para la sensibilidad y la especificidad pueden variar dependiendo del contexto analítico específico, así como de los estándares de calidad y las necesidades del analista.

En general, se busca que tanto la sensibilidad como la especificidad sean altas, lo que significa que el método tiene una alta capacidad para detectar correctamente tanto los casos positivos como los negativos. Sin embargo, es importante destacar que en algunos casos puede haber un trade-off entre sensibilidad y especificidad. lo que quiere decir que, aumentar la sensibilidad de un método puede reducir su especificidad y viceversa (ISO 13843, 2017). Por lo tanto, la elección de valores específicos para sensibilidad y especificidad dependerá de las necesidades analíticas específicas y de los objetivos del estudio o la aplicación en cuestión, que, para este caso, se trata de determinar organismos fitoplanctónicos viables.

Las variables relacionadas a la prueba de rendimiento se expresan como un valor entre 0 y 1, donde 1 es perfecta y 0 es nula (Cohen, 1968) (Tabla 10).

Tabla 13. Criterio del parámetro de acuerdo a su valor.

VALOR DEL PARAMETRO	CRITERIO
<0,20	Nula
0,21 - 0,40	Leve
0,41 - 0,60	Moderada
0,61 - 0,80	Sustancial
0,81 - 1	Perfecta

Tabla 14. Estratificación a partir de pruebas de rendimiento de FDA e Índice de Concordancia de Kappa para la determinación de viabilidad de organismos Fitoplanctónicos.

PARÁMETROS	VALOR OBTENIDO	CRITERIO
Sensibilidad	1,00	Perfecta
Especificidad	0,50	Moderada
Eficiencia	0,73	Sustancial
Tasa de falsos positivos	0,37	Leve
Tasa de falsos negativos	0,00	Nula
Selectividad	0,46	Moderada
Índice de Concordancia	0,61	Sustancial

En una tabla de contingencia, los falsos negativos son importantes porque representan una clasificación incorrecta de casos negativos como negativos por parte de un método analítico (ISO 13843,2017). El uso del reactivo FDA no permite una determinación directa de falsos negativos en la viabilidad de los organismos fitoplanctónicos en el sentido de una evaluación estadística de los

errores de tipo II (falsos negativos), y esto es debido a que el reactivo está diseñado para identificar células vivas y metabólicamente activas (Baek & Shin, 2009).

El hecho de que el reactivo FDA no marque a un organismo como muerto se debe a que el proceso de hidrólisis del FDA dentro de la célula solo ocurre en células metabólicamente activas. Si un organismo está muerto, pero aún conserva su estructura celular, el reactivo FDA puede penetrar en la célula, pero no habrá actividad metabólica para convertirlo en fluoresceína; por lo tanto, el uso del reactivo FDA no es adecuado para identificar falsos negativos en el contexto de un análisis de viabilidad celular, y esto se debe a que el reactivo FDA no puede distinguir entre células muertas y células vivas, pero no metabolizantes (Baek & Shin, 2009).

De acuerdo a lo mencionado y a los resultados obtenidos en la prueba de rendimiento, se demuestra con exactitud que el método de análisis es capaz de cuantificar con precisión concentraciones tan bajas como las que puede detectar, por lo que para dicha validación se establece que el LOQ es igual al LOD

Tabla 15. Límite de Cuantificación para el método.

LÍMITES	VALOR OBTENIDO
Límite de Cuantificación	2 cel/mL

5. LÍMITE SUPERIOR DE CUANTIFICACIÓN

Límite superior

Descripción: Rango máximo de concentración de un analito que puede ser cuantificado de manera precisa y confiable utilizando ese método en particular. Este límite está determinado por la capacidad del método para detectar y medir con precisión concentraciones altas del analito sin saturación del sistema de detección o interferencias significativas (ISO 13843, 2017).

Resultados:

Las muestras naturales, especialmente las provenientes de entornos acuáticos como bahías, pueden generar interferencias significativas en la determinación de la viabilidad de organismos fitoplanctónicos, aumentando la incertidumbre del método. Estas interferencias pueden deberse a factores la materia orgánica, que como se mencionó anteriormente, la presencia de alta carga de materia orgánica en muestras eutrofizadas puede complicar la determinación de la viabilidad del fitoplancton (Baek & Shin, 2009). La materia orgánica puede interferir con los métodos de análisis y dificultar la interpretación de los resultados, es por esta razón que para hallar el límite superior de cuantificación se tuvo en cuenta valores históricos de viabilidad y los datos obtenidos de una muestra natural eutrofizada, obteniendo los siguientes resultados:

Tabla 16. Resultados obtenidos a partir de muestras naturales de un sistema eutrofizado.

Analista 1			Analista 2		
Total de	Sometidas a	Células	Total de	Sometidas a	Células

partículas	verificación	confirmadas	partículas	verificación	confirmadas
359	165	59	379	316	70
429	286	50	308	347	52
247	144	58	327	206	70
311	143	65	498	251	73
225	147	55	437	214	60
537	335	65	254	337	58
523	363	78	395	200	72
2631	1583	430	2598	1871	455

Tabla 17. Estadística descriptiva para analizar los datos recopilados de los resultados obtenidos a partir de muestras naturales de un sistema eutrofizado.

Promedio	63
Desviación Estándar	9
Dato Mínimo	50
Dato Máximo	78

El límite superior de trabajo en viabilidad de organismos fitoplanctónicos dependió de la saturación de las células y la interferencia de la materia orgánica y fibras fluorescentes. cuando la carga de la muestra es muy alta, el ensayo requiere generar más diluciones de trabajo. Por ello, el límite superior viene definido por la capacidad del detector de mantener la proporcionalidad en los datos, es por esta razón que para dicha validación se tomó el dato máximo registrado en las muestras naturales eutrofizadas como el límite superior de cuantificación del método.

Tabla 18. Límite superior de Cuantificación para el método.

LÍMITES	VALOR OBTENIDO
Límite superior de Cuantificación	78 cel/mL

6. PRECISIÓN

Para la mayoría de los métodos analíticos estandarizados, los indicadores de calidad se distribuyen mediante una función cuyas propiedades son completamente conocidas y que representan la distribución normal ampliamente utilizada en el estudio estadístico de métodos y pruebas en laboratorios.

Dado que las unidades de viabilidad del fitoplancton son las células (cel), en muchos casos estas cel deben convertirse a valores que permitan "normalizar" su distribución definida. El método utilizado para realizar esta transformación consiste en calcular los logaritmos de las cel en las que se distribuyen los valores según una función normal y permite calcular los parámetros de Precisión Intermedia y Repetibilidad en una validación (APHA, 2023).

De esta forma, al trabajar con los logaritmos de las cel podemos trabajar con las herramientas básicas y bien conocidas asociadas a la distribución normal y simplificar cálculos que, de no realizar esta transformación, resultarían mucho más complejos.

La precisión intermedia y la repetibilidad para este caso se logró trabajando con una matriz de agua de lastre, tanto con tratamiento (Filtración + UV) como sin tratamiento. Lo que implica llevar a cabo pruebas o experimentos con fines de comparar los resultados entre el agua de lastre tratada y no tratada para evaluar la eficacia del tratamiento, del reactivo diacetato de fluoresceína (FDA) y para comprender mejor las propiedades del agua en diferentes condiciones.

Cabe resaltar que las muestras de agua de lastre, tanto tratadas como sin tratar, fueron sometida previamente a un análisis (Autoimagen) mediante citometría de flujo para detectar la presencia de organismos de la comunidad fitoplanctónica, los cuales no fueron observados. Se evidenció una alta carga de sedimentos en ambas muestras. Por lo tanto, antes de proceder con el análisis de viabilidad, se enriquecieron las muestras con muestras naturales de un sistema eutrófico en una concentración de 1:100 (10-2), con la finalidad de garantizar que tanto el método, como el equipo y los analistas produzcan resultados consistentes y confiables antes de su implementación.

Precisión Intermedia

Descripción: Indica la precisión en donde los resultados del ensayo son obtenidos con el mismo método sobre muestras idénticas en diferentes días con diferentes analistas y posibles equipos diferentes (APHA, 2023).

La precisión de los resultados analíticos cuantitativos de células vivas en muestras de agua de lastre se evaluó mediante análisis replicados. El uso de conteos replicados se hace únicamente para el propósito de determinar la precisión. Los análisis replicados son particularmente importantes cuando un laboratorio o analista es nuevo en un método, o se espera que un método o matriz genere resultados considerablemente variables (APHA, 2023).

Como primera fase se realizó el análisis de duplicados de las primeras 15 muestras positivas de cada tipo de matriz, con cada conjunto de duplicados analizados por los analistas, cuyos datos fueron registrados para calcular el logaritmo de cada resultado, con fines de determinar el rango (R) para cada par de duplicados transformados y la media (R) de estos rangos (APHA, 2023) (Tablas 19-20).

Tabla 19. Calculo de criterio de precisión de muestras de agua de lastre con sistema de tratamiento por Filtración + UV, enriquecida con muestra natural de un sistema Eutrofizado.

MUESTRA No.	RESULTADOS POR ANALISTA		LOGARITMOS DECIMALES DEL CONTEO		RANGO DE LOGARITMOS (R _{Log}) (Log A1 - Log A2)
	A1	A2	Log A1	Log A2	
1	9	8	0,9542	0,9031	0,0512
2	7	7	0,8451	0,8451	0,0000
3	8	8	0,9031	0,9031	0,0000
4	9	8	0,9542	0,9031	0,0512
5	8	7	0,9031	0,8451	0,0580
6	9	8	0,9542	0,9031	0,0512

7	9	7	0,9542	0,8451	0,1091
8	9	8	0,9542	0,9031	0,0512
9	7	7	0,8451	0,8451	0,0000
10	9	7	0,9542	0,8451	0,1091
11	7	9	0,8451	0,9542	0,1091
12	7	8	0,8451	0,9031	0,0580
13	8	7	0,9031	0,8451	0,0580
14	9	8	0,9542	0,9031	0,0512
15	9	9	0,9542	0,9542	0,0000
Σ de R_{log}	0,7572				
$\bar{R}$	0,0505				
Criterio de Precisión*	0,1641				

Tabla 20. Calculo de criterio de precisión de muestras de agua de lastre sin sistema de tratamiento enriquecida con muestra natural de un sistema Eutrofizado.

MUESTRA No.	RESULTADOS POR ANALISTA		LOGARITMOS DECIMALES DEL CONTEO		RANGO DE LOGARITMOS (R_{log}) (Log A1 - Log A2)
	A1	A2	Log A1	Log A2	
1	10	9	1,0000	0,9542	0,0458
2	10	8	1,0000	0,9031	0,0969
3	9	8	0,9542	0,9031	0,0512
4	10	9	1,0000	0,9542	0,0458
5	10	8	1,0000	0,9031	0,0969
6	10	10	1,0000	1,0000	0,0000
7	10	9	1,0000	0,9542	0,0458
8	9	8	0,9542	0,9031	0,0512
9	8	9	0,9031	0,9542	0,0512
10	9	10	0,9542	1,0000	0,0458
11	9	10	0,9542	1,0000	0,0458
12	9	10	0,9542	1,0000	0,0458
13	10	9	1,0000	0,9542	0,0458
14	10	8	1,0000	0,9031	0,0969
15	8	9	0,9031	0,9542	0,0512
Σ de R_{log}	0,8156				
$\bar{R}$	0,0544				
Criterio de Precisión*	0,1767				

Resultados:

Se procedió a realizar nuevamente los duplicados, calculando su rango como se indicó

anteriormente. Si el rango es $<3.27 \cdot R$, hay una probabilidad del 99% de que la variabilidad del laboratorio sea adecuada (APHA, 2023), por lo que se expresa que los resultados de las mediciones son consistentes y reproducibles (Tabla 21-22).

Tabla 21. Verificación de la precisión de los conteos duplicados por analistas de muestras de agua de lastre con sistema de tratamiento por Filtración + UV, enriquecida con Muestra natural de un sistema Eutrofizado.

MUESTRA No.	RESULTADOS POR ANALISTA		LOGARITMOS DECIMALES DEL CONTEO		RANGO DE LOGARITMOS (R_{log}) (Log A1 - Log A2)	RANGO ACEPTADO**
	A1	A2	Log A1	Log A2		
1	9	7	0,9542	0,8451	0,1091	A
2	9	8	0,9542	0,9031	0,0512	A
3	7	8	0,8451	0,9031	0,0580	A
4	7	8	0,8451	0,9031	0,0580	A
5	9	8	0,9542	0,9031	0,0512	A
6	7	9	0,8451	0,9542	0,1091	A
7	8	7	0,9031	0,8451	0,0580	A

*Criterio de Precisión = $(3,27 \cdot \bar{R}) = 0,1641$

** A = Aceptado; I = Inaceptable

Tabla 22. Verificación de la precisión de los conteos duplicados por analistas de muestras de agua de lastre sin sistema de tratamiento enriquecida con muestra natural de un sistema Eutrofizado.

MUESTRA No.	RESULTADOS POR ANALISTA		LOGARITMOS DECIMALES DEL CONTEO		RANGO DE LOGARITMOS (R_{log}) (Log A1 - Log A2)	RANGO ACEPTADO**
	A1	A2	Log A1	Log A2		
1	8	7	0,9031	0,8451	0,0580	A
2	8	7	0,9031	0,8451	0,0580	A
3	9	8	0,9542	0,9031	0,0512	A
4	9	8	0,9542	0,9031	0,0512	A
5	8	9	0,9031	0,9542	0,0512	A
6	7	8	0,8451	0,9031	0,0580	A
7	7	7	0,8451	0,8451	0,0000	A

*Criterio de Precisión = $(3,27 \cdot \bar{R}) = 0,1767$

** A = Aceptado; I = Inaceptable

Repetibilidad

Descripción: Precisión obtenida bajo las mismas condiciones de operación en un intervalo corto de

tiempo, por un mismo analista, en la misma muestra homogénea y en el mismo equipo. Con fines de verificar el parámetro en un método, es necesario calcular el coeficiente de variación, el cual debe ser menor al 10%, de igual forma, se debe calcular el coeficiente de variación de Horwitz, y así comparar %Cv y %Cv_{H/2}. Para que los métodos sean repetibles se debería cumplir la siguiente relación:

$$\%Cv < \%Cv_{H/2}$$

Resultados:

Al igual que en la Precisión Intermedia, se trabajó con el conjunto de duplicados analizados por los analistas. APHA (2023) indica que el control de calidad en la repetibilidad de una muestra debe tener un criterio de %CV < 10%. Además, el Laboratorio del CIOH emplea la ecuación de Horwitz, con el objetivo de evaluar la precisión del método analítico, bajo este parámetro se considera aceptable cuando el coeficiente de variación por repetibilidad calculado (%CV) es menor que el coeficiente de variación de Horwitz (Cv_{H/2}).

De acuerdo a lo mencionado anteriormente, los resultados obtenidos para ambos analistas demuestran que la repetibilidad del método analítico se considera aceptable, cumpliendo con los criterios establecidos (Tablas 23 – 24).

Tabla 23. Datos de los conteos duplicados por analistas de muestras de agua de lastre con sistema de tratamiento por Filtración + UV, enriquecida con Muestra natural de un sistema Eutrofizado. %Cv= Coeficiente de variación, Cv_{H/2}= coeficiente de variación de Horwitz.

MUESTRA No.	RESULTADOS POR ANALISTA		LOGARITMOS DECIMALES DEL CONTEO	
	A1	A2	Log A1	Log A2
1	9	7	0,9542	0,8451
2	9	8	0,9542	0,9031
3	7	8	0,8451	0,9031
4	7	8	0,8451	0,9031
5	9	8	0,9542	0,9031
6	7	9	0,8451	0,9542
7	8	7	0,9031	0,8451
Promedio	0,9002	0,8938		
Desviación Estándar	0,0546	0,0382		
CV%	6,06	4,27		
CV% Teórico	10%	10%		
%Cv _{H/2}	22,99	23,01		
Criterio de Aceptación*	%Cv < %Cv _{H/2}	%Cv < %Cv _{H/2}		
	A	A		

*A = Aceptado; I = Inaceptable

Tabla 24. Datos de los conteos duplicados por analistas de muestras de agua de lastre sin sistema de tratamiento enriquecida con muestra natural de un sistema Eutrofizado. %Cv= Coeficiente de

variación, $Cv_{H/2}$ = coeficiente de variación de Horwitz.

MUESTRA No.	RESULTADOS POR ANALISTA		LOGARITMOS DECIMALES DEL CONTEO	
	A1	A2	Log A1	Log A2
1	8	7	0,9031	0,8451
2	8	7	0,9031	0,8451
3	9	8	0,9542	0,9031
4	9	8	0,9542	0,9031
5	8	9	0,9031	0,9542
6	7	8	0,8451	0,9031
7	7	7	0,8451	0,8451
Promedio	0,9011	0,8855		
D. estandar	0,0446	0,0419		
CV%	4,95	4,74		
CV% Teorico	10%	10%		
% $Cv_{H/2}$	22,98	23,05		
Criterio de Aceptación*	% $Cv < \%Cv_{H/2}$	% $Cv < \%Cv_{H/2}$		
	A	A		

*A = Aceptado; I = Inaceptable

7. PORCENTAJE DE RECUPERACIÓN

Porcentaje de Recuperación

Descripción: Se define como la proximidad entre la media de un número infinito de valores medidos repetidos y un valor de referencia. En alineación a éste atributo se determina el porcentaje de recuperación en los blancos fortificados y muestras naturales fortificadas de alta y baja concentración (APHA, 2023).

La veracidad también puede ser evaluada con base en el error relativo, absoluto o porcentaje de recuperación (%). Teniendo en cuenta el criterio conocido como límite de determinación, el cual se define como la concentración mínima utilizada en las pruebas con la que se obtiene una recuperación media aceptable. El intervalo recomendado para la aceptación del porcentaje de recuperación puede variar dependiendo del método analítico, la matriz de la muestra y los requisitos específicos del análisis. Sin embargo, como regla general, un porcentaje de recuperación aceptable suele estar en el rango del 85% al 115%.

Es importante tener en cuenta que estos límites pueden variar según las regulaciones específicas del laboratorio o las especificaciones del método.

El porcentaje de recuperación se obtiene con la siguiente expresión:

$$\%R = \frac{\text{Valor obtenido}}{\text{Valor esperado}} * 100$$

Resultados:

El intervalo de aceptación para un método cuantitativo de organismos fitoplanctónicos podría

necesitar ser más amplio en comparación con otros tipos de análisis debido a la naturaleza de las muestras y las características biológicas de los organismos.

Los organismos fitoplanctónicos pueden ser muy sensibles a las condiciones ambientales, como la temperatura, la luz y los nutrientes, lo que puede influir en su distribución y abundancia en una muestra de agua (Baek & Shin, 2009). Además, las muestras de agua pueden ser altamente variables en términos de composición y concentración de organismos, lo que puede afectar la precisión y la exactitud de las mediciones (Baek & Shin, 2009; Lundgreen et al., 2019).

Dado estos factores, es posible que se necesite un intervalo de aceptación más amplio para el porcentaje de recuperación en un método cuantitativo de organismos fitoplanctónicos para tener en cuenta esta variabilidad natural. Un rango de aceptación más amplio puede ayudar a compensar las fluctuaciones en las condiciones ambientales y las diferencias en la composición de las muestras, permitiendo una evaluación más precisa de la precisión del método (Lundgreen et al., 2019).

Es importante que el intervalo de aceptación sea lo suficientemente amplio como para abordar la variabilidad natural, pero también lo suficientemente estrecho como para garantizar mediciones precisas y confiables (APHA, 2023), por lo que para la presente validación se decidió ampliar el intervalo entre un 80 y 120%.

Los ensayos realizados indicaron un porcentaje de conformidad con el criterio establecido en las muestras con y sin sistema de tratamiento evaluados, lo cual permite confirmar que el método es veraz (Tablas 25 – 26).

Tabla 25. Porcentaje de recuperación (%R) de muestras de agua de lastre con sistema de tratamiento por Filtración + UV, enriquecida con Muestra natural de un sistema Eutrofizado.

MUESTRA (Cel/mL)	A1	%R	A2	%R
Criterio de aceptación: % Recuperación 80 - 120 %				
8	9	110,53	7	85,96
	9	110,53	8	98,25
	7	85,96	8	98,25
	7	85,96	8	98,25
	9	110,53	8	98,25
	7	85,96	9	110,53
	8	98,25	7	85,96

Tabla 26. Porcentaje de recuperación (%R) de muestras de agua de lastre sin sistema de tratamiento enriquecida con muestra natural de un sistema Eutrofizado. %Cv= Coeficiente de variación, $CvH/2$ = coeficiente de variación de Horwitz.

MUESTRA (Cel/mL)	A1	%R	A2	%R
Criterio de aceptación: % Recuperación 80 - 120 %				
8	8	103,70	7	90,74
	8	103,70	7	90,74
	9	116,67	8	103,70

	9	116,67	8	103,70
	8	103,70	9	116,67
	7	90,74	8	103,70
	7	90,74	7	90,74

8. INCERTIDUMBRE

A partir de los equipos e instrumentos involucrados en el método M5-00-PRO-110 Determinación de viabilidad de organismos fitoplanctónicos en aguas de lastre. se realizó el cálculo de la incertidumbre de la medición para la determinación de viabilidad de organismos fitoplanctónicos en agua de lastre, a través de la solución FDA por citometría de flujo; los siguientes procesos fueron identificados en el método:

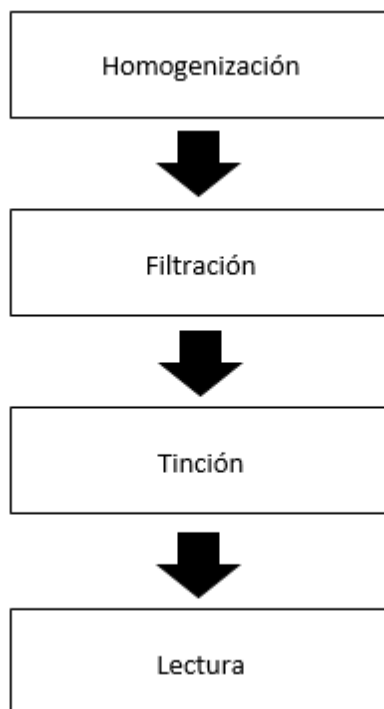


Figura 2. Procesos del método “Determinación de viabilidad de organismos fitoplanctónicos en aguas de lastre”.

Adicionalmente, a los procesos que se desarrollan en la Determinación de viabilidad de organismos fitoplanctónicos en aguas de lastre, se identificaron las posibles entradas y fuentes de incertidumbre, así:

Tabla 27. Identificación de los procesos del método, entradas y fuentes de incertidumbre.

ETAPAS DIAGRAMA DE FLUJO	ENTRADA	IDENTIFICACIÓN DE FUENTES DE INCERTIDUMBRE
1. Homogenización	1.1. Condiciones ambientales del laboratorio. 1.2. Homogenización	1.1. Temperatura y humedad ambiental. Tipo de error sistemático, se debe garantizar condiciones de sugerida en la realización de los ensayos por el laboratorio. 1.2. Homogenización manual. Error sistemático.
2. Filtración	2.1. Condiciones ambientales del laboratorio. 2.2. Filtración de la muestra en campo. 2.3 Filtración de la muestra en laboratorio 2.4. Analistas.	2.1. Temperatura y humedad ambiental. Tipo de error sistemático, se debe garantizar condiciones de trabajos sugerida en la realización de los ensayos por el laboratorio. 2.2. Malla 20 µm. Tipo de error sistemático, el procesamiento debe garantizarse con materiales en óptimo estado. 2.3. Malla 10-50 µm. Tipo de error sistemático, el procesamiento debe garantizarse con materiales en óptimo estado. 2.4. Incertidumbre aportada por analistas. Error sistemático por competencias del analista.
3. Tinción	3.1. FDA y DMSO 3.2. Temperatura de almacenamiento del reactivo. 3.3. Tinción de la muestra. 3.4. Analistas	3.1. Preparación de reactivos. Tipo de error sistemático, generado principalmente por la vidriería. 3.2. Variaciones en la temperatura de almacenamiento. Error sistemático, el equipo refrigerante debe estar en óptimas condiciones. 3.3. Aplicación de tinción con transferpipetas. Error sistemático. 3.4. Incertidumbre aportada por analistas. Error sistemático por competencias del analista.
4. Lectura	4.1. Mantenimiento y Calibración equipo. 4.2 Configuración Equipo FlowCam. 4.3. Condiciones ambientales del laboratorio. 4.4. Analista	4.1. Sesgo en la medición del equipo. Error sistemático verificar certificado de calibración. 4.2. Que el operador no realice bien la programación del equipo. 4.3. Temperatura y humedad ambiental. Tipo de error sistemático, se debe garantizar condiciones de trabajos sugerida en la realización de los ensayos por el laboratorio. 4.4. Incertidumbre aportada por analistas. Error sistemático por competencias del analista.

Por otra parte, y con el fin de integrar las fuentes de incertidumbre en común en cada uno de los procesos identificados y facilitar el cálculo de la incertidumbre, se procede realizar el siguiente grafico de causas efectos del método a evaluar:

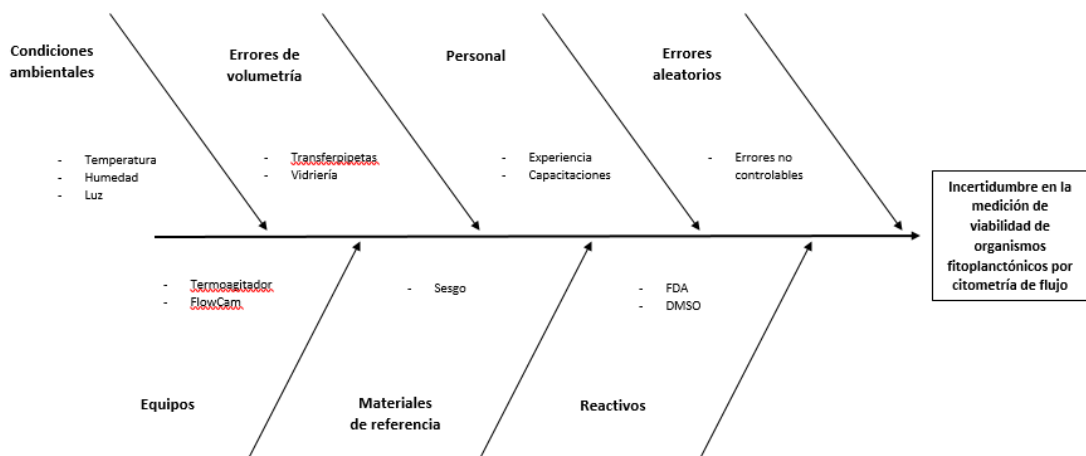


Figura 3. Causas efectos del método Determinación de viabilidad de organismos fitoplanctónicos en aguas de lastre.

De acuerdo a lo mencionado en la tabla 24 y el modelo conceptual descrito anteriormente, se puede detallar las fuentes de incertidumbre identificadas que afectan el método. No obstante, existen algunas fuentes que por su naturaleza o su magnitud son difíciles de cuantificar o correlacionar

directamente con la incertidumbre de la medición. Por lo tanto, no suelen ser incluidas en el cálculo de la incertidumbre de manera directa. En este caso, por ejemplo, los errores aleatorios, la experiencia y capacitación del personal, las condiciones ambientales y equipos como la FlowCAM; corresponden a las condiciones anteriormente mencionadas. Sin embargo, es permitido tomar resultados de los parámetros de validación que miden la influencia de todas estas fuentes como es el caso de la repetibilidad y la precisión intermedia.

Consecuentemente a la agrupación de las fuentes, fue calculada la incertidumbre estándar por componente la incertidumbre combinada y la incertidumbre expandida (Tabla 28 - 29), considerando los lineamientos dados por la guía “Cuantificación de la Incertidumbre en Mediciones Analíticas” referenciados en Eurachem/CITAC, 2012, seguidas por el laboratorio Sede Caribe de la Dirección General Marítima.

Tabla 28. Calculo de la estándar por componente del método Determinación de viabilidad de organismos fitoplanctónicos en aguas de lastre por citometría de flujo.

FUENTES	DETALLES Y UNIDADES	VALOR REPORTADO DE ERROR O INCERTIDUMBRE	DISTRIBUCIÓN ESTADÍSTICA	INCERTIDUMBRE ESTÁNDAR POR COMPONENTE
Equipos	FlowCAM	1,0000	Normal	0,44721360
	Balanza Analítica	0,0029	Normal	0,00129692
	Transferpipeta 20 - 200 µm	0,6600	Normal	0,29516097
	Transferpipeta 100 - 1000 µm	0,6800	Normal	0,30410524
Vidriería	Balón Clase A de 20 mL	0,0129	Triangular	0,0052664
	Balón Clase A de 10 mL	0,0118	Triangular	0,0048173
	Pipeta volumétrica de 10 mL	0,1000	Triangular	0,0408248
Precisión	Calculada con base a los datos reportados en Repetibilidad y Precisión intermedia de una muestra natural	0,2215	Normal	0,0990536

Tabla 29. Calculo de la incertidumbre combinada y expandida del método Determinación de viabilidad de organismos fitoplanctónicos en aguas de lastre por citometría de flujo.

Incetidumbre	Valor obtenido
Incetidumbre combinada	0,6254
Incetidumbre expandida	1,2508

CONCLUSIONES

De acuerdo a los resultados obtenidos para cada uno de los parámetros de calidad, el Laboratorio de la DIMAR Sede Caribe, declara, que se cumplieron los objetivos propuestos de la validación del método analítico “Determinación de viabilidad de organismos fitoplanctónicos en aguas de lastre”, presentando resultados de límites de Detección, Prueba de rendimiento (Sensibilidad, Especificidad, Eficiencia, Tasa de falsos positivos, Tasa de falsos negativos, Selectividad e Índice de Concordancia), Límite de Cuantificación, Límite superior de cuantificación, precisión (Precisión Intermedia y repetibilidad) y Porcentaje de Recuperación satisfactorios, en el intervalo de trabajo $\leq 1 - \leq 78$ cel/mL, leídos a través de la técnica de citometría de flujo con dos canales de fluorescencia (Ch1 y Ch2) y reportando una incertidumbre expandida de ± 1.2508 .

El Laboratorio de la DIMAR Sede Caribe declara confiabilidad de sus resultados mediante la utilización del método de Determinación de viabilidad de organismos fitoplanctónicos en aguas de lastre.

BIBLIOGRAFÍA

- American Public Health Association (APHA), American Water Works Association (AWWA), Water Environment Federation (WEF). Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 24th Edition. American Public Health Association, American Water Works Association, Water Environment Federation, 2023. Método 1076-Part 9000.
- Currie, L. A. (1995). Nomenclature in evaluation of analytical methods including detection and quantification capabilities (IUPAC Recommendations 1995). Pure and applied chemistry, 67(10), 1699-1723.
- Cohen, J. (1968). Weighted kappa: nominal scale agreement with provision for scaled disagreement or partial credit. Psychological Bulletin, 70, 213–220.
- ISO 13843:2017. "Microbiology of the food chain - Horizontal method for the enumeration of microorganisms - Colony count technique at 30 degrees C". International Organization for Standardization, 2017.
- 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.
- Williams, A. (2012). EURACHEM/CITAC workshop on recent developments in measurement uncertainty. Accreditation and Quality Assurance, 17(2), 111-113.