

## Muestreo de fitoplancton para extracción de PUAs (aldehídos volátiles poliinsaturados)

Arandia, N.; González-Gordillo, J. I.; Bartual, A.

CACYTMAR, Universidad de Cádiz

### Finalidad. Campo de aplicación

Metodología para obtener muestras de fitoplancton para posterior extracción, caracterización y cuantificación de Aldehídos volátiles insaturados.

### Conceptos generales

Las diatomeas constituyen un grupo fundamental en las cadenas tróficas marinas tradicionalmente explotadas, protagonizando grandes proliferaciones o *blooms* en una escala espaciotemporal previsible y asociada a un aumento en la disponibilidad de nutrientes. Durante la última década, numerosos trabajos se han centrado en el estudio de un tipo de compuesto de carácter alelopático liberado por diatomeas. Se trata de aldehídos volátiles poliinsaturados (PUA), eminentemente decadienal y octadienal, que son liberados ante la presión de herbivoría, y por tanto tras un daño celular. De ahí, que una de las funciones atribuidas a este tipo de compuestos sea defensiva, por su toxicidad para el zooplancton consumidor, principalmente copépodos. Este hecho constituye hoy día un punto de discusión importante, especialmente cuando se trata de evaluar las implicaciones tróficas así como el significado ecológico de estas sustancias. Un segundo papel que se ha atribuido a estas sustancias es de señal infoquímica intercelular, pudiendo actuar como reguladoras en la sucesión y colapso de un *bloom*. Poco se sabe, sin embargo, del efecto que las condiciones ambientales, muy cambiantes en el desarrollo de un *bloom*, puedan tener en el

proceso de síntesis de precursores de estos PUA, e incluso, se desconoce si pueden inducir o regular de algún modo su liberación. No se pueden descartar, además, otros efectos de interés ecológico, como la ventaja competitiva de las especies productoras frente a las no productoras ante el ataque de un consumidor. Además, prácticamente no se conoce qué cantidad de estos PUAs existen en el medio natural, tanto en episodios de *bloom* como en entornos propicios para las diatomeas.

### Equipamiento necesario

Termosalinómetro continuo del barco.

### Descripción de la técnica

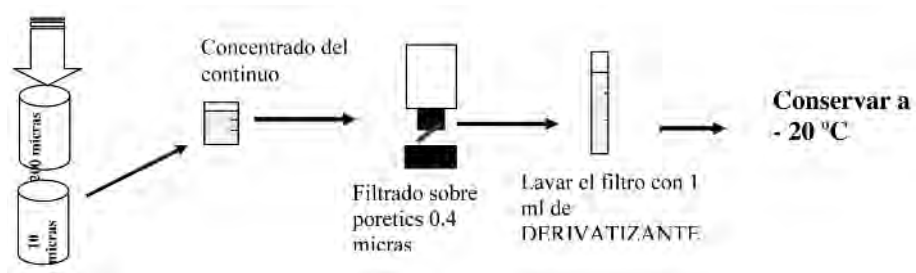
#### *Toma de muestras*

1. Medir el flujo (l/min) del termosalinómetro continuo del barco y apuntarlo en el estadillo.
2. Al llegar al punto de muestreo (apuntar fecha, hora y estación con coordenadas en el estadillo) filtrar un volumen mínimo de 50 l por mallas consecutivas de 200 micras y 10 micras.
3. Apuntar en el estadillo tiempo de filtrado del continuo sobre malla de 10 micras (nos permitirá deducir el volumen total empleado).
4. Concentrar el fitoplancton acumulado en la malla de 10 micras en un vaso de precipitados.
5. Filtrar el contenido del vaso sobre filtro poretics de 0.4 micras.
6. Lavar el filtro sobre vial de vidrio etiquetado con *1 ml de DERIVATIZANTE* (0 - (2, 3, 4, 5, 6, - Pentafluorobencil) hidroxilamina (PFBHA-HCl) en 100 nM de Tris-HCl a pH: 7.0) usando pipeta automática y punta azul. El filtro puede colocarse en la pared vertical del tubo y verter el derivatizante sobre este, de forma que la solución vaya arrastrando las células de fitoplancton del filtro. *Si se usaran varios filtros para la misma muestra porque estuviera muy concentrada y tardara mucho en filtrar, tener la precaución de lavar el segundo, tercer... filtro con el mismo ml de reactivo y sobre el mismo vial en el que se lavó el primer l filtro. El volumen final de cada muestra en el vial debe ser SIEMPRE de 1 ml .*
7. Congelar inmediatamente la muestra.
8. Repetir todo el proceso con una segunda una segunda réplica.
9. Volver a medir el flujo del continuo y apuntar en estadillo.
10. Lavar todo el material con agua filtrada o, preferiblemente, con agua dulce.

*Estadillo de datos*

MUESTRAS PUA PROYECTO .....							
FLUJO DEL CONTINUO:						Fecha y hora	L/min.

**Cuadro sinóptico de la técnica**



**Reactivos y material de laboratorio**

**Conservantes:**

- DISOLUCION 25 mM de o-(2,3,4,5,6,-Pentafluorobencil) hidroxilamina (PFBHA-HCl) en 100 mM de Tris-HCl a pH: 7.0.
- Mallas de 200 micras y 10 micras.
- 2 Columnas de filtración (de 25 mm).

- 2 Vasos de precipitados.
- 1 Timer.
- 100 Filtros de policarbonato poretics 0.4 micras-25 mm.
- 1 Pinza Millipore.
- DERIVATIZANTE en bote de topacio.
- Viales de vidrio para almacenamiento de muestras.

### Cálculo de los resultados

El cálculo del volumen concentrado se obtendría simplemente multiplicando el tiempo de filtrado del continuo por el flujo medio del continuo.

### Referencias

WICHARD, T., S. POULET, G. POHNERT. 2005. «Determination and quantification of a,b,d,g.unsaturated aldehydes as pentafluorobenzyl-oxime derivates in diatom cultures and natural phytoplankton populations: application in marine field studies». *J. Chromatogr. B* 814: 155-161.