

METODOLOGIA BASICA PARA EL ESTUDIO DEL FITOPLANCTON CON ESPECIAL REFERENCIA A LAS DIATOMEAS

MARTHA E. FERRARIO, EUGENIA A. SAR y SILVIA E. SALA

Departamento Científico Ficología
Facultad de Ciencias Naturales y Museo
Paseo del Bosque s/n, 1900 La Plata
Argentina

INTRODUCCION	2
RECOLECCION DE LA MUESTRA	2
Redes	3
Recomendaciones para la confección de una red	4
Precauciones para operar la red	5
Recomendaciones para el lavado de la red	6
Botellas	6
Recomendaciones y precauciones	7
PRESERVACION DE LA MUESTRA	7
Recomendaciones y precauciones	10
METODOS DE TRATAMIENTO Y MONTAJE DE DIATOMEAS	10
Tratamiento	10
Método de Simonsen (1974)	12
Método de Hasle & Fryxell (1970)	12
Recomendaciones y precauciones	12
Montaje para estudios con microscopio óptico	13
Recomendaciones y precauciones	14
Montaje para estudios con microscopio electrónico	15
Recomendaciones	16
COLECCIONES	16
SISTEMAS TAXONOMICOS DE REFERENCIA	18
REFERENCIAS	18
ANEXO	20

INTRODUCCION

Aunque mucha información acerca de la rutina de muestreo en el mar puede ser obtenida en capítulos de diferentes textos, entre otros Introducción al fitoplancton marino (Balech, 1977), Phytoplankton Manual (Sournia, 1978) y Atlas de Zooplancton (Boltovskoy, 1981), consideramos necesario incluir en este Manual los fundamentos de las técnicas básicas para el estudio del fitoplancton.

En este capítulo trataremos los aspectos relacionados con la recolección, preservación y análisis de muestras, dirigidos fundamentalmente al grupo de las diatomeas fitoplanctónicas. El objetivo es presentar una descripción de los equipos y métodos de uso general en el estudio del fitoplancton, tomando en cuenta principalmente aquellos más simples, de manejo sencillo y menor costo que, correctamente aplicados, aseguren una eficiente obtención de muestras, materiales preparados y datos.

En un anexo presentamos un listado de las Colecciones de Diatomeas de América Latina, con información acerca de las Instituciones en que se encuentran depositadas, curadores y características de cada una de ellas.

RECOLECCION DE LA MUESTRA

Pueden ser utilizados diferentes métodos para la toma de una muestra, su elección dependerá del propósito de la investigación, de las características biológicas y geográficas del lugar, etc.

Un muestreo cualitativo y/o cuantitativo del fitoplancton, se realiza fundamentalmente mediante red o el uso combinado de red-red o red-botella.

Otra forma de recolección se lleva a cabo con bombas que succionan agua desde una determinada profundidad (ejemplo 9 m). El agua extraída se filtra a través de una red, obteniéndose de ese modo muestras continuas de fitoplancton.

Una vez tomada la muestra esta debe ser rotulada con una etiqueta de papel vegetal escrita con lápiz blando o tinta china, que se introduce en el frasco y otra que se pega al mismo sobre el cuerpo, no en la tapa. En dichas etiquetas debe figurar la sigla con que se identifica la campaña, n° de estación (de las que se tendrá latitud, longitud y ubicación en un mapa del área), fecha, n° de botella, profundidad a la que se tomó la muestra y tipo de muestra (de red o de botella). Paralelamente, en una planilla de datos diseñada al efecto, deben asentarse los transcritos a la etiqueta y otros como: colector, condiciones atmosféricas al momento de la recolección, estado del mar, tipo de red o botella, hora en que se colectó, volumen de muestra extraída, tipo de preservante empleado, etc. En esta planilla es conveniente dejar columnas reservadas para asentar datos químicos y físicos que se tomen paralelamente, además de un espacio para observaciones.

Redes

Las redes han sido ampliamente utilizadas para la colecta de fitoplancton, la ventaja de su uso consiste en que filtran grandes volúmenes de agua concentrando los organismos. No obstante, dado que el proceso de filtración es selectivo por tamaño y forma, la muestra obtenida con red presenta una proporcionalidad distorsionada de los componentes del plancton.

Desde 1828, en que J. V. Thompson introduce el uso de red para muestreo de larvas de copépodos, a la actualidad, más de un centenar de diseños han sido propuestos. Algunos de ellos son muy sofisticados, como por ejemplo el de las redes con mecanismo de cierre y apertura para colectas verticales estratificadas. Aquí sólo describiremos una red estándar que puede utilizarse para toma de muestras en superficie y verticales, satisfactorias para investigaciones cualitativas.

Los componentes de una red son: boca, cuerpo o cono filtrante y recipiente colector o copo (Fig. 1). La boca, parte anterior de la red, consiste de un simple anillo o banda que puede ser de plástico o metálico. En este último caso son generalmente de acero inoxidable en las redes grandes, y de bronce o aluminio en las más pequeñas.

Independientemente del tamaño de la red, al anillo que la mantiene abierta se sujetan tres bridas (de cáñamo, nailon o acero), cada una anudada a una argolla que está fija al mismo y ubicada en forma equidistante de las otras. Los extremos libres de las bridas se reúnen en otra argolla o grillete giratorio que está fijo al cable o cabo de remolque.

El cuerpo o cono filtrante de la red, que es la parte más delicada e importante de la misma, está formado por la tela o malla filtrante propiamente dicha y unido a la boca por su parte más ancha y al colector por la más angosta. Este cono puede tener diferente longitud, constar de una sola pieza en las redes de menor tamaño, o estar compuesto de varias bandas o gajos en las mayores.

El recipiente colector o copo, sujeto al extremo posterior del cono filtrante, es el lugar donde se deposita el material filtrado. El copo es generalmente cilíndrico y puede ser cerrado o presentar aberturas o ventanas laterales cubiertas con malla metálica o de tela, intercambiables o no (Fig. 1d).

En las redes manuales el colector puede ser un simple frasco de vidrio o acrílico, mientras que en las grandes es generalmente metálico y está especialmente diseñado con diferentes variantes. El copo puede estar fijo al cono filtrante o ser desmontable, en este último caso se sujeta con abrazaderas o cabos antideslizables.

Durante la toma de las muestras, a fin de mantener tenso el cable que soporta el o los muestreadores, se sujeta a éste un peso o muerto de aproximadamente 50 kg.

La colmatación de la red, es mayor cuanto mayor es el diámetro de la boca, menor la superficie de filtración, o menor la abertura del poro de la malla filtrante.

A fin de aumentar la eficiencia del filtrado, en lo que respecta al diámetro de la boca, es frecuente la utilización de un tipo de red que varía ligeramente de la descripta. La modificación consiste en adosar sobre el anillo un cono truncado, conformándose así una estructura bicónica que disminuye el efecto de colmatación.

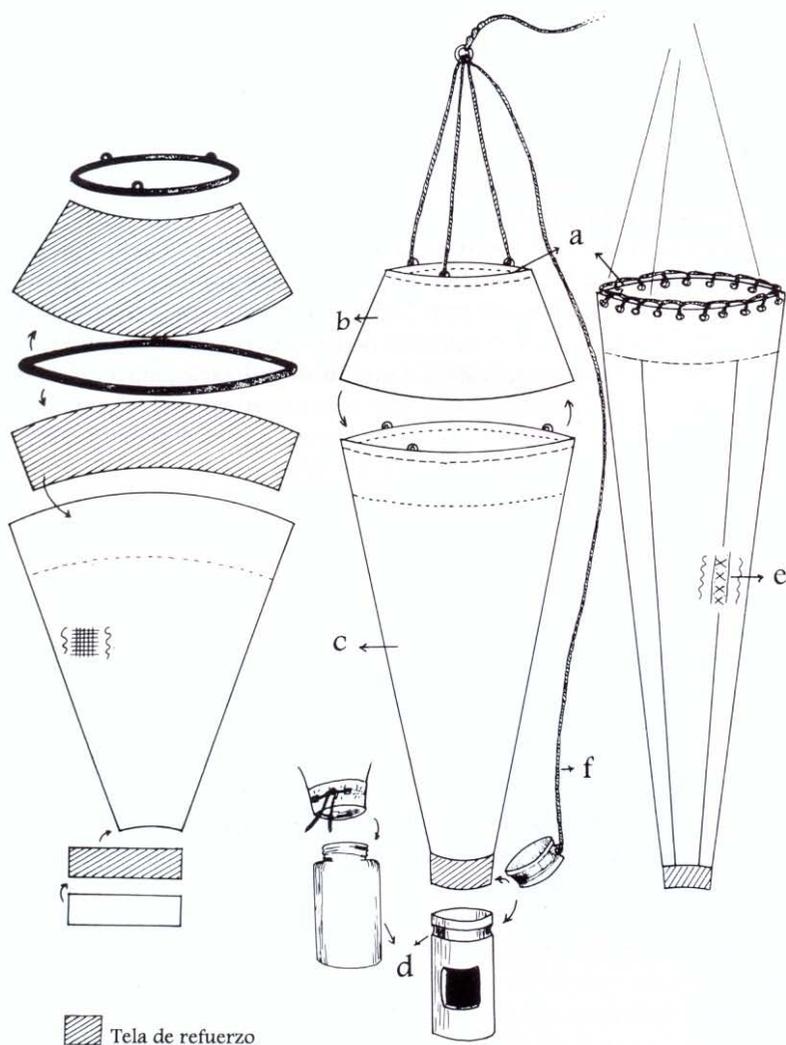


Fig. 1: Red estándar: a- boca; b- cono truncado; c- cono filtrante; d- copo; e- cinta o banda de lona; f- cabo de seguridad.

Recomendaciones para la confección de una red

El modelo de red y la apertura de malla a utilizar dependerán principalmente de la fracción de plancton que nos proponemos estudiar, del tipo de muestreo diseñado (horizontal y/o vertical) y del modo de arrastre (manual o con guinche oceanográfico).

En la confección de una red debe considerarse que:

- Los materiales a emplear deberán ser preferentemente sintéticos por su mayor resistencia a los agentes externos deteriorantes y por su menor toxicidad. Se recomiendan nailon (tipo Nylal 7 P) y perlon (Monodur) (Boltovskoy, 1981:79).
- La medida y uniformidad del tamaño del poro de la malla filtrante, deben ser confirmados bajo microscopio con reglilla micrométrica. Para ello se recorta un trozo de la tela, se lo ubica en un portaobjetos, se lo cubre con medio de montaje o agua y se coloca el cubreobjetos.
- El cono filtrante de redes mayores de 50 cm de longitud debe estar formado por varias bandas o gajos longitudinales (4 bandas hasta 1 m² de boca y 8 bandas para las mayores de 1 m²). Todos los gajos deben ser cortados con la misma orientación y medida.
- El largo del cono filtrante no debe ser mayor de 4-5 veces el diámetro de la boca (Balech, 1977).
- No se recomiendan conos filtrantes con mallas de diferentes tamaños de poro (decrecientes hacia el copo).
- Las zonas de unión o que soportan mayor presión deben reforzarse con:
 - tela resistente, generalmente lona o liencillo, en el lugar de unión de la boca y copo al cono filtrante.
 - cintas o bandas de lona, que deben ser más cortas que la longitud del lado del gajo, en la unión de los gajos.
- Las costuras deben ser hechas con hilo resistente (preferentemente nailon) y en zig-zag, cuidando que la tensión de la puntada sea la adecuada.
- Cuando se utiliza material de acero en la construcción de las bridas, deben protegerse los extremos de ellas o partes finales libres del cable con cinta adhesiva, a fin de evitar eventuales enganches.

Precauciones para operar la red

- Fijar el copo a un cabo de seguridad, el cual debe ser enganchado al grillete del cabo de remolque. Así se evitará la pérdida del mismo en caso de ruptura del cono filtrante.
- Controlar que la velocidad de izado de la red sea continua (sin tirones) y baja. Ella dependerá principalmente del diseño de la red, del estado del mar y de la concentración y tipo de plancton. Con mar normal se recomienda no exceder los 2 nudos por hora de velocidad si la malla es mayor de 20 μm y reducirla a 0,5 nudos si el poro es menor de 20 μm (Tangen, 1978).
- No arriesgar la red cuando el mar esté muy movido.
- Lavar la red 2 ó 3 veces con el copo abierto en la estación de muestreo, antes de tomar la muestra correspondiente.

Recomendaciones para el lavado de la red

Una vez obtenida la muestra, la red debe ser lavada tan rápidamente como sea posible, a fin de eliminar de la malla las sales que contiene el agua de mar y los microorganismos que obturan los poros. La intensidad del lavado y los químicos que se emplean para llevarlo a cabo, dependerán de la cantidad y tipo de plancton filtrado y del material en que está construida la red.

Los pasos a seguir son:

- Enjuagar con abundante agua dulce, en lo posible tibia, con o sin detergente, todas las partes de la red incluido el copo. Si este tuviera ventanas cubiertas con malla metálica o de tela, lavarlas suavemente con un cepillo de cerda.
- Si la red se recoge sucia (mucus, petróleo, etc.), lavarla con soluciones alcalinas muy diluida, si es de nailon (por ejemplo, hidróxido de sodio al 15 %), o con soluciones alcalinas o ácidas muy diluidas, si es de poliéster.
- En caso de ser necesario aplicar el paso anterior, volver a enjuagar con abundante agua dulce.
- Secar la red al aire en lugar ventilado, no expuesto al sol y guardarla en un lugar fresco debidamente protegida.

Botellas

Las botellas son empleadas para obtener muestras de un volumen determinado a una profundidad establecida. La ventaja de su uso consiste en que estas muestras son cuali-cuantitativamente representativas del sitio en que se recolectan. Su principal limitación, para encarar estudios florísticos, estriba en la escasez del material que se obtiene en cada lance, a lo que se agrega el inconveniente de tener que concentrarlo (centrifugación, decantación, etc.).

Entre los numerosos modelos descriptos, son las botellas Nansen, Niskin y Van Dorn las más frecuentemente utilizadas. Aquí daremos sus características generales, remitiendo a la bibliografía para consulta sobre detalles de las mismas (Venrick, 1978).

El cilindro de plástico o metal que conforma la botella, posee en cada extremo una válvula o "sopapa" (goma-PVC) generalmente de su mismo diámetro, que accionada por un sistema mecánico (mensajero) o electrónico, actúa a modo de cierre y apertura. En la base del cilindro se ubica el grifo de desagote, que es el sitio por el que se extrae la muestra.

La capacidad de este cilindro es variable, desde menos de 1 litro hasta los 100 litros o más, utilizándose normalmente botellas no mayores de 30 litros, para muestreos de fitoplancton.

Según el área, y el tipo de investigación planteado, las botellas pueden ser utilizadas manualmente desde un bote o desde la costa, o ser arriadas con guinche desde un barco.

En una campaña oceanográfica cuando uno de los objetivos perseguidos consiste en interpretar la distribución del plancton en un perfil vertical de la columna de agua, las botellas pueden ser lanzadas de una por vez a las diferentes profundidades o, más comúnmente, ser ubicadas a lo largo de un cable oceanográfico

("casting") o sobre una base circular metálica (roseta). En este último caso por debajo de las botellas está adosado un sistema de toma automático de datos que emplea registradores electrónicos de salinidad, temperatura y profundidad (STD) (Fig. 2).

Ante la carencia de esta infraestructura se acopla a cada botella un termómetro reversible de modo de obtener la temperatura a la profundidad respectiva y se extrae en cada nivel una muestra a fin de medir la salinidad.

La elección de las profundidades a que se realizará el muestreo debe ser hecha considerando la profundidad de la zona eufótica en el área de estudio y las hipótesis sobre las cuales se trabaja. En aguas antárticas (oligotróficas y muy transparentes de la zona del Estrecho de Gerlache) para la realización de un estudio sobre distribución vertical del fitoplancton, se fijaron los siguientes niveles de muestreo: superficie (aproximadamente 2 m), 5, 10, 15, 25, 50, 75, 100, 150 m y eventualmente 200 m.

El volumen de muestra a extraer dependerá de la densidad del plancton en el área de muestreo. En ambientes marinos oligotróficos un volumen de 500 ml nos ha resultado suficiente para realizar conteo de células y concentrar material a fin de llevar a cabo un análisis cualitativo.

Recomendaciones y precauciones

- Para el izado de una botella, un "casting" o la roseta, deben observarse las mismas normas que para el izado de redes, es decir, velocidad baja y constante.
- La muestra debe ser tomada tan rápidamente como sea posible, a fin de evitar que comience la sedimentación de los fitopláncotes, que es fuente de error.
- Si se utilizan botellas de pequeño volumen, hasta 10 litros, antes de extraer la muestra es recomendable homogeneizar el contenido con movimientos suaves. Esto evitará que se sobreestime el número de células por litro, particularmente el de los pláncotes más pesados que sedimentan más rápidamente.
- En caso de que la rutina de trabajo obligue a alguna demora en la toma de las muestras, y las botellas no puedan ser manipuladas, es importante utilizar las que tienen grifos cercanos a la base del cilindro.
- Cuando la muestra se extrae con el objeto de llevar a cabo estudios de productividad primaria, o de contaminación por metales, no deben utilizarse botellas que tengan partes metálicas.

PRESERVACION DE LA MUESTRA

Las muestras de fitoplancton pueden presentar una gran variedad en lo que concierne a los pláncotes que las componen, de manera que la elección del líquido



Fig. 2: a- maniobra de arriado de la roseta; b- toma de muestras a bordo del buque.

fijador-preservador debe hacerse teniendo en cuenta principalmente al grupo taxonómico que será objeto de estudio, en nuestro caso las diatomeas. Puede suceder, no obstante, que en el marco de los objetivos propuestos, resulte de interés conservar, del mejor modo posible, a todos los integrantes de la muestra. En este caso, para la elección del preservante, se deberá considerar la conjugación de requerimientos de los organismos presentes para una eficiente fijación. De todos los agentes fijadores-preservadores conocidos, los que se emplean más ampliamente para muestras de fitoplancton, son el formaldehído y la solución de Lugol.

El formaldehído se utiliza en solución acuosa al 4%, esta solución se denomina frecuentemente "formol" o "formalina" al 10%, lo que ha llevado a confusiones en lo referente a la concentración real, como lo señala Steedman (1981). Para preparar esta solución se emplean 10 ml de formaldehído comercial (40%) por cada 90 ml de muestra a fijar o de agua filtrada. La solución, aproximadamente neutra en un principio, si se prepara con agua de mar, tiene una tendencia a ir acidificándose con el tiempo (Thronsen, 1978). Esto no constituye un problema si el material cuya preservación se privilegia son las diatomeas, ya que un pH por encima de 7 propende a la disolución de las estructuras silíceas (Hasle, 1978).

Una mezcla de formaldehído comercial y ácido acético al 100% en proporción 1:1, puede ser utilizada con muy buenos resultados en la preservación de las diatomeas, empleando 20 ml de ésta por cada 80 ml de muestra de red a fijar. Este agente preservante es, en cambio, muy lesivo para los cocolitofóridos, porque el medio ácido produce una disolución drástica de la cubierta celular calcárea.

La utilización de formaldehído en solución acuosa al 4% permite preservar diatomeas, cocolitofóridos y dinoflagelados tecados en buenas condiciones para su identificación, produciendo cierta distorsión de la forma y pérdida de los flagelos a los flagelados desnudos. Thronsen (1978) señala que una concentración al 0,4 % es adecuada para fijar una muestra tomada con botella, mientras que para muestras de red, es necesario una concentración muy superior (6,6 %).

Este preservante, además de ser económico, tiene la ventaja de conservar las muestras por años en buen estado, sin que se requiera darles atención ulterior a la fijación, si son correctamente almacenadas.

El Lugol-acético es utilizado con buenos resultados en la fijación de diatomeas y flagelados.

La solución se prepara del siguiente modo:

- disolver 100 g de KI en 1.000 ml de agua destilada.
- disolver 50 g de I² cristalino en 100 ml de ácido acético glacial.
- incorporar la segunda solución a la primera.
- dejar que decante y transvasar el sobrenadante eliminando el precipitado.

Recomendamos el uso de este preservante, en concentraciones de 0,2 a 0,4 ml por cada 100 ml de muestra, para muestras de agua tomadas con botella a fin de realizar análisis cuantitativos. En este caso la ventaja del Lugol-acético frente al formaldehído consiste en que favorece el asentamiento de las células en el fondo de la cubeta de sedimentación, las tiñe, impidiendo que las muy pequeñas pasen desapercibidas, y preserva mejor las colonias.

Este fijador presenta la desventaja de requerir control periódico del color de

las muestras almacenadas, a fin de reponer el Lugol faltante por oxidación del Iodo.

Recomendaciones y precauciones

A nuestro criterio las muestras tomadas con el propósito de estudiar la flora diatomológica desde el punto de vista cualitativo pueden ser eficientemente fijadas con solución de formaldehído, provengan ellas de botellas o de arrastre de red.

Consideramos en cambio que las muestras tomadas con el objetivo de realizar análisis cuantitativos del fitoplancton deben ser fijadas con Lugol-acético, siempre y cuando no sean los cocolitofóridos componentes del plancton.

Un mecanismo práctico, desde el punto de vista operativo, para fijar muestras en serie, consiste en disponer el líquido fijador en una botella a la que se adosa un dosificador. Este puede ser regulado de modo tal que libere cada vez la cantidad de preservante establecida como necesaria, de acuerdo al volumen de muestra que se está manipulando. El sistema debe estar firmemente sujeto, si se trabaja embarcado, para evitar roturas que conlleven gastos en términos de dinero y esfuerzo, y eventuales perjuicios de salud por inhalación de emanaciones tóxicas de los fijadores.

Las muestras deben ser almacenadas en lugares oscuros y frescos, sin grandes fluctuaciones térmicas, particularmente cuando han sido fijadas con Lugol-acético. Las tapas de los envases pueden ser aseguradas suplementariamente con parafilm a fin de eliminar el riesgo de evaporación o la pérdida de líquido.

MÉTODOS DE TRATAMIENTO Y MONTAJE DE DIATOMEAS

Las diatomeas constituyen uno de los taxones dominantes del plancton marino. Entre los primeros tratados generales acerca del grupo podemos mencionar los de Van Heurck, 1885; Peragallo & Peragallo, 1897-1908 y Schmidt *et al.*, 1874-1959. Una herramienta práctica para el estudio taxonómico de las diatomeas es el catálogo de géneros y especies de Van Landingham (1967-1979), que incluye la sinonimia de cada taxón y en el que se hace referencia a gran cantidad de material bibliográfico. El trabajo de revisión más reciente, Round *et al.* (1990), está dirigido al análisis morfológico y biológico de los géneros de diatomeas y contiene una nueva propuesta clasificatoria.

Tratamiento

La morfología del frústulo de las diatomeas ha sido y es, eje fundamental de los esquemas clasificatorios propuestos para el grupo. En función de ello, se ha desarrollado una amplia batería de métodos para llevar a cabo la oxidación

de la materia orgánica, a fin de lograr una mejor visualización de las estructuras y ornamentaciones de la cubierta celular silíceas. No obstante, teniendo en cuenta que también es de interés contar con datos sobre la morfología de los plástidos y su disposición en la célula, tipo de colonias, etc., las muestras deben ser observadas en vivo. Una parte de las mismas debe ser fijada y rotulada como material sin tratar y la otra sometida a tratamientos destructivos del protoplasto y rotulada como material tratado, señalando con un código el método empleado.

La remoción de la parte orgánica de la célula puede ser hecha por varios métodos y la elección de uno u otro dependerá del grado de silicificación de los organismos presentes en la muestra y de la necesidad que tengamos de contar con frústulos completos.

Para obtener frústulos completos, la muestra sin preservante, puede ser tratada en primer término con acetona y agua en proporción 3:1. Mediante este procedimiento se remueven pigmentos y lípidos. Posteriormente la muestra debe ser lavada con agua destilada y tratada con solución de pancreatina al 2,5-5 %, a pH 7,6, durante 3 días, a 40°C, con lo que se logra la digestión del protoplasto. Varias técnicas han sido enunciadas sobre la base de estos principios, tal como lo señalan Round *et al.* (1990).

Otro tipo de tratamiento que permite obtener frústulos enteros, ha sido descrito por Hasle *et al.* (1983) y consiste básicamente en adicionar acetona al material, lavarlo, agregarle agua oxigenada y exponerlo a radiación ultravioleta durante un período de tiempo, que se establecerá en cada caso. Otros métodos que se utilizan rutinariamente producen disociación más o menos completa del frústulo en sus piezas constituyentes, lo cual puede ser de interés cuando se desea observar la morfología interna de la valva, detalles de las bandas, etc. Mencionaremos aquí algunos de los que han sido descritos y enunciaremos en líneas generales el de Simonsen (1974), ampliamente utilizado en el tratamiento de muestras y el de Hasle & Fryxell (1970) que nos ha permitido obtener los mejores resultados.

Los métodos drásticos, que usan ácidos fuertes, generalmente producen pérdida de los materiales débilmente silicificados.

Una técnica común consiste en hervir la muestra por unos pocos minutos bajo campana, en una mezcla 1:1:1 de material, de ácido sulfúrico y de ácido nítrico. Balech & Ferrando (1964) describen un protocolo detallado de lo que ellos denominan procedimiento rápido o cruento, en el que se utilizan estos ácidos. Otra variante de esta técnica consiste en tratar la muestra con ácido nítrico y sulfúrico en proporción 1:1:4, sin calentar (Hasle & Syvertsen, 1980).

Entre las técnicas considerablemente menos agresivas podemos mencionar la descrita por Balech & Ferrando (1964) bajo la denominación de procedimiento lento o débil. Para llevarla a cabo se emplea permanganato de potasio en medio ácido y agua oxigenada. Si bien este método permite obtener resultados satisfactorios en el caso de materiales delicados, suele dejar remanentes de protoplasto y además requiere de mucho tiempo (no menos de 24 h).

Método de Simonsen (1974)

Protocolo

- Enjuagar la muestra 2 ó 3 veces, a fin de remover el preservante del siguiente modo: agregar agua destilada, centrifugar y desechar el sobrenadante.
- Adicionar permanganato de potasio saturado en proporción 1:1, agitar y dejar durante 24 h.
- Adicionar, a la solución del paso anterior, ácido clorhídrico concentrado en proporción 1:1, Mezclar. La solución toma color pardo.
- Calentar la solución suavemente hasta que devenga incolora o ligeramente amarillenta.
- Enjuagar con agua destilada hasta dejar la muestra libre de ácido, es decir, hasta que alcance un pH cercano a 7.

Método de Hasle & Fryxell (1970)

Este método es el que nos ha resultado más eficiente con materiales débiles y fuertemente silicificados.

Protocolo

- Colocar una alícuota de muestra libre de preservante en un tubo de centrífuga.
- Adicionar el mismo volumen de ácido sulfúrico y agitar. Debe tomarse la precaución de trabajar bajo campana o por lo menos en sitio con buena ventilación.
- Agregar solución saturada de permanganato de potasio, recién preparada, en pequeñas fracciones, agitando luego de cada adición hasta que la muestra tome color púrpura. En este paso se observa burbujeo.
- Adicionar solución saturada de ácido oxálico, recién preparada, en pequeñas fracciones, agitando suavemente luego de cada adición, hasta que la muestra se decolore.
- Centrifugar y descartar el sobrenadante. En este punto debe procederse cuidadosamente a fin de no perder parte de material.
- Adicionar agua destilada, centrifugar y descartar el sobrenadante. Esta operación de lavado se repite hasta que la muestra alcanza un pH 6.

Recomendaciones y precauciones

La muestra a tratar debe ser lavada con agua destilada, para eliminar el preservante, previamente a la aplicación de cualquiera de las técnicas.

Consideramos altamente recomendable comenzar los tratamientos en tubos de centrífuga. La ventaja de trabajar directamente en los tubos es que evitaremos transvasar muestra con reactivos para realizar las centrifugaciones, ahorrándonos riesgos de pérdida de material y eventuales accidentes.

El agregado de los reactivos debe hacerse con pipetas largas, en pequeñas

cantidades y por las paredes del tubo, de modo de prevenir salpicaduras. El tubo debe sostenerse mediante broche de pata larga, con la boca ubicada en sentido opuesto al operador. En el caso de reacciones exotérmicas es recomendable mantener los tubos en grillas y siempre que se liberen vapores, es necesario trabajar bajo campana o, en caso de no contar con ella, en lugares con muy buena ventilación.

La operación de pipeteo de los reactivos no debe llevarse a cabo con la boca sino mediante pipetas provistas con peras de goma, se evitarán así la inhalación de vapores y eventual ingestión de reactivos.

El proceso de centrifugación de la muestra debe realizarse entre 1.500 y 2.000 rpm durante 5 ó 10 minutos, ya que mayores velocidades podrían destruir setas, elevaciones u otras estructuras delicadas. En caso de material con frústulos muy livianos, es necesario aumentar el tiempo de centrifugación a 30 minutos o más.

Una vez realizada la primera centrifugación es imprescindible constatar si se ha producido daño del material y si éste ha sedimentado adecuadamente. Para ello es necesario montar una gota del material sedimentado y una gota del sobrenadante, entre porta y cubre. Ambos preparados deben ser observados al microscopio, tomando la precaución de evitar el contacto del líquido ácido con estativo y objetivos. Si aparecen organismos en el sobrenadante será necesario centrifugar por más tiempo y si el tipo de material lo permite, a mayor velocidad.

El lavado de la muestra debe hacerse con agua destilada, recientemente preparada, atendiendo las recomendaciones expuestas para el procedimiento de centrifugación. A fin de asegurar un lavado efectivo del material compactado en el fondo del tubo, éste debe ser agitado delicadamente al adicionar el agua, hasta lograr la resuspensión del sedimento. Luego de repetir la operación varias veces, generalmente se logra una muestra libre de ácido, cuyo pH debe oscilar entre 6 y 7. A fin de verificarlo se utilizan cintas o líquido indicador (Merck, pH 4-10), siendo este último el más recomendable.

Montaje para estudios con microscopio óptico

Una vez que se verifica que el material ha quedado debidamente limpio, y antes de adicionar formaldehído a la muestra, se puede proceder a montarlo en preparados permanentes. El primer punto a considerar, en ese caso, es la elección del medio de montaje, la cual deberá hacerse en función de la calidad y ventajas que éstos ofrecen y de la factibilidad económica de adquirirlos.

Un medio de altísima calidad y fácil manejo, muy recomendable a nuestro criterio, es el Hyrax, pero en este momento el producto ha dejado de fabricarse. El Naphrax, que es también una resina sintética con alto índice de refracción, es utilizado por muchos diatomólogos con excelentes resultados.

Una resina natural, que es empleada con pobres resultados, es el Bálsamo de Canadá de uso corriente. Su desventaja consiste en que tiene un índice de refracción análogo al de los frústulos. La razón por la que algunos lo eligen es por su bajo costo y su facilidad de obtención en droguerías. En nuestra opinión si se quiere hacer un trabajo taxonómico cuidadoso, no debe utilizarse este medio y

debe escogerse entre los mencionados anteriormente u otros disponibles en el mercado, acerca de los cuales se pueden hallar comentarios en Reid (1978).

El método más recomendable de montaje de diatomeas en preparados permanentes es el descrito por Hasle & Fryxell (1970), a partir del cual planteamos la siguiente rutina de procedimiento:

- Colocar cubreobjetos limpios en una placa de cobre. Esta actúa como difusor del calor que recibe de un mechero de Bunsen. De no contarse con dicha placa, puede utilizarse una tela de amianto.
- Colocar en cada cubreobjetos entre 1 y 4 gotas de muestra tratada, dependiendo el número de gotas de la densidad de la muestra. Si la muestra es muy densa, usar 1 sola gota y adicionar 3 gotas de agua destilada.
- Dejar secar y adicionar 1 ó 2 gotas de medio de montaje, mediante el uso de varilla de vidrio muy delgada.
- Invertir el cubreobjetos sobre un portaobjetos previamente lavado y calentado, cuando se verifica que la resina se ha ablandado lo suficiente.
- Dejar el preparado en placa caliente hasta que la resina se funda y se extiende alcanzando los límites del cubreobjetos. Evitar que se produzca ebullición del medio de montaje.
- Eliminar las burbujas de aire que puedan haber quedado retenidas en el preparado, por calentamiento y presión muy suavemente dirigida partiendo de un ángulo, para lo que pueden utilizarse palillos de madera. El calentamiento puede hacerse sobre la placa o flameando el preparado directamente sobre llama baja.
- Eliminar los restos de resina del borde del cubreobjetos con una navajilla o bisturí. Esperar para hacerlo que la resina esté completamente seca.
- Rotular con etiqueta permanente.

A fin de realizar observaciones sobre la morfología de frústulos intactos, tipos de colonia, etc., pueden realizarse preparados fijos de material sin tratar. En estos casos el procedimiento de montaje que se emplea es idéntico al que acabamos de describir para el material tratado.

Recomendaciones y precauciones

Los cubreobjetos y portaobjetos sobre los cuales se realizarán los montajes deben ser repasados con alcohol o xilol a fin de desengrasarlos. La manipulación de los mismos se hará por sus bordes, para evitar que se ensucien por contacto con los dedos.

Las gotas de material deben ser depositadas en el centro del cubreobjeto, luego de lo cual el líquido puede ser distribuido homogéneamente en la lámina, expeliendo aire a través de la pipeta. Durante esta operación debe evitarse que el líquido salga del límite del cubreobjetos y se filtre entre la cara limpia de éste y la placa de cobre.

Un hecho a ser tomado en cuenta, por la importancia que tendrá cuando se analicen los preparados, es la densidad de material con que se inicia el trabajo de montaje. Si este estuviera muy poco concentrado, es recomendable volver a centrifugar y eliminar el sobradante antes de disponerlo en el cubreobjetos. Si por el contrario hay gran concentración de material, conviene depositar 1 ó 2 gotas de agua destilada y sobre ellas una gota de material tratado. A fin de verificar si la densidad obtenida es adecuada, se observa el cubreobjetos con microscopio óptico, luego de la evaporación del líquido y antes de adicionar medio de montaje.

Cuando se realiza tratamiento y montaje de muestras en serie, es importante utilizar una pipeta para cada muestra, descartándola luego. De no contarse con tal cantidad de material de vidrio, éste deberá ser inmediata y cuidadosamente enjuagado luego de cada uso. Estos recaudos nos permitirán evitar indeseables contaminaciones de una muestra con otra.

Si el medio de montaje a emplear se encuentra muy endurecido, puede ablandárselo a baño maría y, de ser necesario, agregando una cantidad pequeña del solvente adecuado según indicación del fabricante. Este procedimiento nos permitirá una mejor manipulación y un ahorro considerable de resina.

Una vez terminadas las preparaciones y para acelerar el proceso de secado, éstas deben ser dispuestas en estufa a 50-60°C, o cerca de una fuente de calor, de modo que se evapore el exceso de solvente del medio de montaje. Recién en este momento los preparados pueden ser manipulados, rotulados en forma definitiva y dispuestos en cajas en posición vertical, sin riesgo de deslizamiento del material y/o de los cubreobjetos.

Los rótulos deben llevar indicación explícita acerca de si el material montado ha sido tratado para oxidación de materia orgánica o no.

Montaje para estudios con microscopio electrónico

Las diatomeas pueden ser estudiadas desde el punto de vista ultraestructural, tanto con microscopio electrónico de transmisión (MET) como con microscopio electrónico de barrido (MEB).

Si lo que se desea analizar es la ultraestructura del protoplasto, las observaciones deberán ser realizadas con MET, para lo cual el material será tratado y montado de acuerdo con el procedimiento descrito por Cáceres en este texto. Si el estudio está dirigido, en cambio, a la morfología del frústulo, pueden utilizarse ambos tipos de microscopios y el material será tratado por los métodos de oxidación de materia orgánica ya descritos.

El MET, que nos da una imagen bidimensional, suele ser más adecuado para la observación en detalle de estructuras tan delicadas como el velo de las areolas.

En la actualidad la mayor parte de los estudios sobre morfología del frústulo son llevados a cabo con MEB, que tiene la ventaja de proporcionarnos imágenes tridimensionales.

Las diatomeas muy débilmente silicificadas requieren de un tratamiento previo al montaje, al que se denomina punto crítico, cuya descripción la indica Boltovskoy en este texto. De las diatomeas bien silicificadas pueden obtenerse

mejores imágenes si se les aplica punto crítico, pero esta aplicación no es de ningún modo imprescindible.

Técnicas especiales de estereoscopía, descritas por Navarro en este texto permiten obtener las microfotografías con mayor grado de detalle y de más fácil interpretación.

Para las observaciones con MET el material debe ser montado en grillas con una película soporte. La técnica para el montaje de los materiales es reseñada por Hasle (1978), una vez finalizada esta labor es recomendable mirar la grilla al microscopio óptico antes de llevarla al MET.

Para realizar estudios con MEB se procede al montaje de los materiales según la siguiente rutina:

- Lavar la muestra previamente tratada, con agua destilada para eliminar el preservante, atendiendo las recomendaciones expuestas para la limpieza de los frústulos.
- Montar 1 gota de material sobre un porta-espécimen de vidrio. Estos porta-espécimenes pueden fabricarse cortando portaobjetos con una punta de diamante.
- Secar a temperatura ambiente o bajo lámpara, evitando contaminación por polvo.
- Montar los tacos de vidrio sobre un taco metálico cementándolos con plata coloidal.
- Metalizar con oro-paladio.

Recomendaciones

A fin de verificar si la densidad y distribución del material es la adecuada, se examina el taco de vidrio bajo microscopio óptico, luego de la evaporación del líquido, como paso previo a la metalización. En caso de que el material problema sea escaso, puede repetirse el procedimiento descrito sobre el mismo vidrio, luego de lo cual, conviene señalar con marcador la ubicación de los especímenes que nos interesan, lo que ahorrará tiempo durante el examen al MEB.

Cuando se desea analizar el tipo de areolas, la correspondencia de estructuras en vista externa e interna, etc., el material montado puede ser roturado con varilla de vidrio antes de ser metalizado.

En lo concerniente a la metalización, si bien suelen utilizarse oro o platino, lo más recomendable es emplear oro-paladio, ya que con esta combinación se obtiene la máxima resolución.

COLECCIONES

Las muestras sin tratar, las fracciones de muestras tratadas y los preparados fijos deben reunirse con método para constituir una colección.

El primer punto a considerar para llevar a cabo este propósito es la elección

de los envases en los que se preservarán las muestras, que deberán reunir los siguientes requisitos:

- ser de vidrio de color oscuro, con boca angosta y doble tapa, lo que asegurará mayor eficiencia de conservación.
- tener un volumen de alrededor de 125 ml para las muestras sin tratar y de 10 ml para las tratadas.

Otro aspecto esencial es el criterio de rotulación, que deberá ser común a muestras y preparados. Las etiquetas sobre las cuales se asienten los datos deben ser adheridas a frascos y preparados y posteriormente parafinadas para evitar eventuales pérdidas y/o deterioros.

La información que debe constar en los rótulos es la siguiente:

- Nombre de la colección.
- Lugar y fecha de recolección.
- Número de muestra.
- Colector.

En el caso de tener varios preparados de cada muestra será necesario asignar a cada uno de ellos un número de serie.

Todos estos datos y otros complementarios (características ambientales del sitio de colección, taxones dominantes en la muestra, etc.) serán asentados en un libro de entradas o en una base de datos.

Estos materiales debidamente rotulados y correlativamente numerados, deben ser guardados en muebles adecuados para evitar daños y extravíos. Consideraciones sobre este punto han sido expuestas detalladamente por el curador de la Sección Ficología del Herbario del Canadian Museum of Nature (Poulin & Hamilton, 1991).

Una colección para cumplir adecuadamente con su función debe contar además, con una persona a cargo de ella, con quien puedan contactar los investigadores que deseen realizar algunas consultas. Los requisitos expuestos para la organización de una colección en lo concerniente a medios, infraestructura y personal, ponen de manifiesto la conveniencia de centralizar la custodia de materiales en Instituciones cuyos objetivos se focalicen en esta tarea.

Todo el esfuerzo que hagan investigadores e Instituciones en crear y mantener colecciones sería estéril, si no se diera a conocer la existencia de las mismas. Para ello es recomendable que sean indexadas, el procedimiento a seguir es señalado por Ramírez en este texto.

Fryxell (1975) publicó una lista de las colecciones de diatomeas más importantes del mundo, con muy pocas referencias sobre América Latina, haciendo mención de las depositadas en México, Brasil y Venezuela. Ante esta falta de información consideramos de interés recopilar datos referentes a las colecciones latinoamericanas, para lo cual tomamos contacto con diatomólogos de los países del área. Aunque las respuestas recibidas han sido escasas, consideramos igualmente valioso presentarlas compendiadas en un Anexo de este capítulo y proponemos a los lectores que nos envíen datos de sus colecciones a fin de poder completar esta tarea.

El aislamiento y mantención de organismos en cultivos unialgales, constituye otro mecanismo para el establecimiento de una colección. Entre los Centros más

importantes en los que se mantienen cultivos de diatomeas, se encuentran la Culture Collection of Algae and Protozoa (CCAP) (Thompson *et al.*, 1988); la Culture Collection of Algae at the Norwegian Institute of Water Research (Skulberg, 1985) y la Freshwater Diatom Culture Collection at Iowa (Czarnecki, 1987). Este tipo de colecciones presenta la ventaja de posibilitar la realización de estudios fisiológicos, bioquímicos y biológicos de las especies, pero es costoso en términos de materiales, infraestructura y personal. Un mecanismo alternativo para mantener cultivos es la criopreservación, que consiste en conservar células vivas a temperaturas inferiores a 0°C. Actualmente en el CCAP se mantienen cepas de Cyanophyta, Chlorophyta y Euglenophyta a -196°C en nitrógeno líquido. En lo referente a las Bacillariophyceae, esta técnica ha dado mejores resultados para especies marinas que para especies de agua dulce (McLellan, 1989). La ventaja de esta técnica de conservación de materiales consiste en que requiere un esfuerzo de mantenimiento mínimo.

SISTEMAS TAXONOMICOS DE REFERENCIA

El creciente interés por la conservación de la diversidad biológica ha llevado a revalorizar las colecciones como elementos de referencia y a desarrollar nuevas metodologías para simplificar el manejo de la información taxonómica preexistente.

En las Actas del XII International Diatom Symposium, llevado a cabo en 1992, se publicaron varios trabajos sobre bases de datos para protistas. Un sistema de información dedicado a los protistas de las aguas costeras escandinavas, el Linnaeus Compact Disk, ha sido desarrollado por el Institute of Marine Research de Bergen, Noruega y es distribuido por el Expert-Center for Taxonomic Identification de Amsterdam (Estep *et al.*, 1993). El Royal Botanic Garden de Edinburgo y el Natural History Museum de Londres están elaborando en forma conjunta una base de datos taxonómicos e iconografías relacionadas, referida exclusivamente a las diatomeas (Droop *et al.*, 1993). Ambos sistemas taxonómicos de referencia contienen descripciones, información sobre nomenclatura, tipos, publicaciones, distribución e imágenes de las especies que tratan. El Linnaeus C. D. tiene además un subprograma para realizar identificaciones a partir de los datos aportados por el usuario.

REFERENCIAS

- Balech, E., 1977. Introducción al fitoplancton marino. EUDEBA, Buenos Aires, Argentina, 211 pp.
- Balech, E. & H.J. Ferrario, 1964. Fitoplancton marino. EUDEBA, Buenos Aires, Argentina, 157 pp.
- Boltovskoy, D., 1981. Obtención de muestras de plancton. Redes. In D. Boltovskoy (ed.), Atlas de Zooplancton del Atlántico Sudoccidental y métodos de trabajo con el zooplancton marino. Publicación especial del INIDEP, Mar del Plata, Argentina :15-35.
- Boltovskoy, D., 1981. Atlas de Zooplancton del Atlántico Sudoccidental y métodos de trabajo con el

- zooplankton marino. Boltovskoy, D. (ed.) Publicación especial del INIDEP, Mar del Plata, Argentina, 936 pp.
- Czarnecki, D.B., 1987. The Freshwater Diatom Culture Collection at Loras College, Dubuque, Iowa. *Notul. Nat.* 465: 1-16.
- Droop, S.J.M., P.A. Sims, D.G. Mann, & R.J. Pankhurst, 1993. A taxonomic data base and linked iconograph for diatoms. In H.van Dam (ed.), Twelfth International Diatom Symposium. *Hydrobiologia* 269/270: 503-508.
- Estep, K., R. Sluys & E.E. Syvertsen, 1993. "Linnaeus" and beyond: workshop report on multimedia tools for the identification and database storage of biodiversity. In H. van Dam (ed.), Twelfth International Diatom Symposium. *Hydrobiologia* 269/270: 519-525.
- Fryxell, G.A., 1975. Diatom Collection. In R. Simonsen (ed.), Third Symposium on Recent and Fossil Marine Diatoms. *Nova Hedwigia*, Heft 53: 355-365
- Hasle, G.R., 1978. Some specific preparations: Diatoms. In A. Sournia (ed.), *Phytoplankton manual*. UNESCO, Paris :136-142.
- Hasle, G.R. & G.A. Fryxell, 1970. Diatoms: cleaning and mounting for light and electron microscopy. *Trans. Amer. Microsc. Soc.* 89:469-474.
- Hasle, G.R. & E.E. Syvertsen, 1980. The diatom genus *Cerataulina*. Morphology and taxonomy. *Bacillaria* 3:79-113.
- Hasle, G.R., H.A. von Stoch & E.E. Syvertsen, 1983. Cymatosiraceae, a new Diatom Family. *Bacillaria* 6:9-156.
- McLellam, M.R., 1989. Cryopreservation of Diatoms. *Diat. Res.* 4:301-318.
- Peragallo, H. & M. Peragallo, 1897-1908. Diatomées marines de France et des districts maritimes voisins. Micrographe Editeur, á Grez-sur-Loing (S. et M.). Text 491 pp + 48 pp; Atlas 137 pls.
- Poulin, M. & P. Hamilton, 1991. Some aspects of the curation and conservation of the diatom collection at the Canadian Museum of Nature. *Diat. Res.* 6: 345-349.
- Reid, F.M.H., 1978. Permanent slides. In A. Sournia (ed.), *Phytoplankton manual*. UNESCO, Paris :115-118.
- Round, F.E., R.M. Crawford & D.G. Mann, 1990. *The Diatom. Biology and morphology of the genera*. Cambridge University Press, Great Britain, 747 pp.
- Schmidt, A., M. Schmidt, F. Fricke, H. Heiden, O. Müller & H. Hustedt, 1874-1959. Atlas der Diatomaceen kunde. R. Reisland, Leipzig. Tafeln 1-480.
- Simonsen R., 1974. The diatom plankton of the Indian Ocean Expedition of R/V "Meteor" 1964-1965. *Meteor Forsch. Ergebnisse Reihe D.* 19:1-107.
- Skulberg, O.M., 1985. Catalogue of Strains. Norsk Institutt for Vannforskning (NIVA), Oslo.
- Sournia, A., 1978. *Phytoplankton manual*. In A. Sournia (ed.). UNESCO, Paris, 337 pp.
- Steedman, H.F., 1981. Fijación y preservación de zooplankton marino *in toto*. In D. Boltovskoy (ed.), Atlas de Zooplankton del Atlántico Sudoccidental y métodos de trabajo con el zooplankton marino. Publicación especial del INIDEP, Mar del Plata, Argentina :117-128.
- Tangen, K., 1978. Nets. In A. Sournia (ed.), *Phytoplankton manual*. UNESCO, Paris :50-58.
- Thompson, A.S., J.C. Rhodes & I. Pettman, 1988. Culture Collection of Algae and Protozoa, Catalogue of Strains. (CCAP) Windermere.
- Thronsen, J., 1978. Preservation and storage. In A. Sournia (ed.), *Phytoplankton manual*. UNESCO, Paris :69-74.
- Van Heurck, H., 1880-1885. Synopsis des Diatomées de Belgique. Atlas, pl. 1-30, 1880; pl. 31-77, 1881; pl. 78-103, 1882; pl. 104-132, 1883; pl. A, B, C, 1885. Ducaju et Cie. Anvers. Table Alphabetique, J.F. Dieltjens, Anvers, 120 pp., 1884. Texte, Mtin. Brouwers & Co., Anvers, 235 pp., 1885. Types du Synopsis des Diatomées de Belgique, Serie I-XXII, 1880-1887.
- Van Landingham, S., 1967-1979. Catalogue of the fossil and recent genera and species of Diatoms and their synonyms. 1:1-493 (1967); 2:494-1086 (1968); 3:1087-1756 (1969); 4:1757-2385 (1971); 5:2386-2963 (1975); 6:2964-3605 (1978); 7:3606-4241 (1978); 8:4242-4654 (1979). J. Cramer, Vaduz.
- Venrick, E.L., 1978. Sampling techniques: Water bottles. In A. Sournia (ed.), *Phytoplankton manual*. UNESCO, Paris :33-40.

ANEXO

COLECCIONES DE DIATOMEAS DE AMERICA LATINA

ARGENTINA

Departamento Científico Ficología, Facultad de Ciencias Naturales y Museo, Universidad Nacional de La Plata. Paseo del Bosque s/n, 1.900 La Plata.

Colección de Diatomeas Argentinas del Dr. J. Frenguelli: 2.105 preparados fijos de materiales provenientes de ambientes dulceacuícolas y marinos de Argentina y Antártida. 330 preparados fijos de materiales provenientes de Bolivia, Chile, Italia, Uruguay y Somalia.

Incluye los materiales tipo de los taxones descritos por este autor.

Colección Cordini: 231 preparados fijos de materiales provenientes de ambientes dulceacuícolas de Argentina.

Colección del Departamento Científico Ficología (LPC): 1.500 preparados fijos de materiales provenientes de ambientes dulceacuícolas y marinos de Argentina y Antártida, acompañados por sus respectivas muestras sin tratar y tratadas en medio líquido.

Incluye los materiales tipo de 10 taxones.

Colecciones de referencia:

Temperé & Peragallo - Diatomeas del mundo entero (1907), 2ª edición: 1.000 preparados fijos de materiales provenientes de ambientes dulceacuícolas y marinos.

Möller: 99 preparados fijos.

Facultad de Ciencias Naturales, Universidad Nacional de la Patagonia. Belgrano 504, 2º Piso. 9100 Trelew.

Colección de Diatomeas de Chubut y Río Negro: preparados fijos y muestras en medio líquido de materiales provenientes de ambientes estuarinos, marinos y dulceacuícolas.

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Departamento de Ciencias Biológicas, Universidad de Buenos Aires. Ciudad Universitaria, Pabellón 2, 4º Piso, Núñez. 1428 Buenos Aires.

Laboratorio de Ficología

Colección: materiales actuales y fósiles provenientes de ambientes dulceacuícolas

de la República Argentina. En la mayoría de los casos con preparados permanentes.

Laboratorio de Limnología y Ficología

Colección: materiales provenientes de ambientes dulceacuícolas de Argentina y Antártida.

Museo Argentino de Ciencias Naturales "Bernardino Rivadavia". Avda. Angel Gallardo 470. 1405 Buenos Aires, C.C. 200.

Colección Müller Melchers: 45 preparados fijos de materiales fósiles provenientes de diversas partes del mundo, acompañados en algunos casos por muestras archivadas en medio seco.

Colección de Diatomeas Fósiles: 1.825 preparados fijos de materiales provenientes en su mayoría de Argentina y Antártida, generalmente acompañados de muestras archivadas en medio seco.

BRASIL

Setor Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, Centro Politécnico - Jardim das Américas 81530- 900 Curitiba, Paraná.

Colección del Departamento de Botánica (UPCB): 262 muestras en medio líquido provenientes de ambientes dulceacuícolas y 147 de ambientes marinos de Brasil.

Secretaría da Agricultura, Instituto de Botânica (SP). Caixa Postal 4.005 São Paulo. Según Fryxell (1975)

Exsiccata

CHILE

Departamento de Botánica, Universidad de Concepción. Casilla 2407, Concepción. E. mail: primavera@buho.dpi.udec.cl.

Colección Diatomológica del Departamento de Botánica de la Universidad de Concepción (DIAT-CONC): 7.785 preparados fijos y muestras en medio líquido de materiales provenientes de ambientes marinos y dulceacuícolas de Chile y Antártida, materiales de otras partes del mundo y de diversas expediciones.

Incluye los tipos de taxones descritos por investigadores chilenos y gran parte de los descritos por investigadores extranjeros, sobre materiales provenientes de Chile.

COLOMBIA

Unidad de Ecología y Sistemática UNESIS, Pontificia Universidad Javeriana. Cra 7 A N° 43-82. Bogotá, Colombia ó Apartado Aéreo 56710, Bogotá, Colombia.

Colección: preparados fijos de muestras provenientes de ambientes dulceacuícolas de Colombia.

Instituto de Investigaciones Marinas de Punta de Betín “José Benito Vives De Andreís”. Apartado Aéreo 1016, Santa Marta, Colombia.

Colección: muestras provenientes de ambientes marinos del Caribe colombiano.

MEXICO

Instituto de Ciencias del Mar y Limnología, Universidad Nacional Autónoma de México. Apartado Postal 70-305. México 04510 D.F.

Colección: preparados fijos y muestras en medio líquido de ambientes marinos y estuarinos del Golfo de México.

Colección de materiales fósiles de México: preparados fijos, material preservado en medio líquido de ambientes estuarinos de México y material en diatomita.

Estación de Investigaciones Marinas Mazatlán, Instituto de Ciencias del Mar y Limnología, UNAM. Apartado Postal 811, Mazatlán, Sinaloa, C.P. 82240, México.

Colección: preparados fijos y muestras preservadas en medio líquido provenientes de ambientes marinos y estuarinos de México.

Centro de Investigaciones de Quintana Roo, Zona Industrial N° 2, Carr. Chetumal, Bacalar C.P. 77.000, A.P. 424, Chetumal, Q. Roo.

Colección: principalmente preparados fijos de materiales marinos de diversos sitios de México (Pacífico, Golfo de México y Caribe), y de materiales fósiles y actuales de diversas partes del mundo.

Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas CICIMAR, Instituto Politécnico Nacional. Apartado Postal 592, La Paz, Baja California Sur, C.P. 23000, México.

Colección: Aproximadamente 2.500 muestras en medio líquido de ambientes marinos del Golfo de California y Costa Occidental de la Península de Baja California.

NICARAGUA

**Centro para la Investigación en Recursos Acuáticos de Nicaragua C.I.R.A.N.
Apartado postal 4.598, Managua.**

Colección: preparados fijos y muestras de materiales en medio líquido provenientes de ambientes dulceacuícolas de Nicaragua. No incluye materiales tipo.

PANAMA

Centro de Ciencias del Mar y Limnología, Facultad de Ciencias Naturales y Exactas, Universidad de Panamá. Apartado 8738, Zona 5, Panamá.

Colección: preparados fijos y muestras en medio líquido.

VENEZUELA

Instituto Oceanográfico de Oriente. Apartado Postal 94. Cumaná. Según Fryxell (1975).

Colección del Instituto Oceanográfico (CUM).