

DESCRIPCIÓN DE MÉTODOS DE RECOLECCIÓN Y CONSERVACIÓN DE ALGAS

por

Carmen Vergara, Herbario de la Universidad de Panamá.

cvalgae@hotmail.com

INTRODUCCIÓN

Las algas constituyen uno de los grupos más variados de talófitas o plantas “inferiores”. Las más evolucionadas poseen estructuras sencillas comparables a las raíces, tallos y hojas de las plantas “superiores”. Son los primeros vegetales que efectúan la fotosíntesis. Poseen según el grupo, pigmentos de diversos colores y así encontramos algas verdes, amarillentas, azulosas, pardas, rojas, etcétera.

Se encuentran en su mayoría, en las aguas marinas, dulces o salobres; flotando o adheridas a las rocas; en los medios terrestres muy húmedos, o en los lados sombreados de los troncos de los árboles, etc. La latitud y los factores ambientales tales como la cantidad de luz en las diversas profundidades del agua, la temperatura de la misma, nutrientes y disponibilidad de sustrato, tienen influencia muy marcada en la abundancia y distribución de las especies.

Las especies unicelulares no necesitan sustrato y en su mayoría se acomodan en las capas superficiales del agua, para formar parte del plancton. Muchas especies en cambio, poseen talos grandes y se acomodan con frecuencia sobre sustratos sólidos, como troncos flotantes o de preferencia sobre rocas de las zonas costeras.

Las algas, constituyen un grupo muy amplio y heterogéneo, requiriendo por esta razón, de una metodología especial para su preparación como muestras de herbario, que sin ser complicada, ni difícil, es de por sí diferente, a lo conocido y difundido para otros representantes de las plantas.

Dentro de las algas, creemos conveniente delimitar dos grandes grupos en relación con el hábitat: algas de agua dulce y algas marinas. Se hace necesario incluir como un grupo aparte a las diatomeas, presentes en ambos hábitat, como componentes del fitoplancton. Estas últimas requieren de métodos de preparación y conservación diferentes.

La finalidad de la recolección y conservación de cualquier organismo vegetal o animal debe justificarse. La enseñanza y la investigación constituyen dos buenas razones.

La enseñanza biológica requiere usar organismos vivos o especímenes adecuadamente conservados para realizar las observaciones y experimentos de una manera objetiva. Pero muchas veces ni los estudiantes ni los profesores pueden trabajar con organismos útiles para ellos, porque carecen de la información necesaria para saber dónde y cómo recolectarlos o para preservarlos.

El conocimiento y manejo de métodos de recolección y formación de colecciones científicas de algas es una actividad inicial en la formación de los investigadores que se dedican al estudio de estos organismos. Hay pocos problemas biológicos relacionados con trabajos de campo que no requieren eventualmente de la colecta de especímenes.

En la formación de un biólogo, es básico el conocimiento de las técnicas indicadas, pero también lo es para el agrónomo, el veterinario o el médico, dependiendo desde luego, de la investigación que se realice.

Las colecciones constituyen la base de los estudios taxonómicos y son parte fundamental en investigaciones de floras y en trabajos ecológicos de poblaciones y de comunidades. En cualquier estudio biológico el primer paso es identificar el organismo que se está observando. Para un estudio taxonómico formal, la colecta de los organismos es indispensable y, por tanto, el conocimiento de las técnicas adecuadas.

Por otra parte, el tema de la biodiversidad, de tanta recurrencia y debate mundial, no puede ser abordado sin el conocimiento taxonómico de los organismos de cada uno de los grupos que integran el sistema natural. Las colecciones científicas, como testimonio de esta biodiversidad, nuevamente pasan a constituir una herramienta valiosa en este tipo de estudios.

En este trabajo se describen y evalúan los diferentes métodos de colecta, manipulación y preservación de especímenes de algas tanto en el terreno como en el laboratorio para su posterior análisis y determinación taxonómica y se hacen recomendaciones básicas para el desarrollo de esta actividad.

Las notas que hemos preparado pueden ser una guía valiosa para saber dónde y cómo coleccionar los diversos grupos de algas; con qué equipo se pueden coleccionar; cómo se deben preservar los especímenes; dónde y cómo guardarlos; qué notas y datos valiosos se deben tomar del material coleccionado. En todo tipo de estudios, la colecta es un auxiliar del cual no se puede prescindir, y va unida al conocimiento sobre métodos de preservación o de cultivo.

Recomendaciones previas

Cada salida al campo obedece al cumplimiento y obtención de metas de tarea y de objetivos. Es importante programar y planificar el trabajo de campo tomando en consideración los objetivos propuestos, ya que el éxito del trabajo en el terreno dependerá de una buena planificación.

Las actividades de recolección obligan a conocer con anterioridad todos los antecedentes del lugar, se recomienda revisar un mapa actualizado, cartas náuticas, tablas de mareas y conversar con personas que hayan visitado antes el sector. La experiencia personal resulta una fuente informativa valiosa, especialmente cuando se trata de lugares poco explorados y de difícil acceso.

Libreta o libro de campo

Los especímenes coleccionados, con datos inadecuados o sin ellos, carecen de todo valor científico; por esto es importante saber qué notas deben acompañarlos. Por otra parte, es de gran utilidad un diario de notas o libreta de campo, con las observaciones hechas en el campo, tanto acerca de la vegetación como de las características de los lugares en donde se efectúa la colecta y de las técnicas utilizadas, o de los especímenes mismos. Todos estos datos pueden ser la base para estudios biológicos más amplios.

Algunos investigadores acostumbran llevar dos libros diferentes, uno conocido como el diario de actividades y el otro es el catálogo de colecta.

El diario de actividades o diario de campo: Nunca se debe olvidar cuando se efectúa cualquier colecta, o se participa en alguna expedición científica o en una excursión de enseñanza. Se recomienda que el diario consista en una carpeta de donde las hojas puedan sacarse o desprenderse. Existen hojas con gran porcentaje de tela mezclada con papel. En ellas se puede escribir, bajo el agua. Utilizar estas hojas resistentes sería ideal, ya que, en ocasiones, las condiciones son variadísimas e inesperadas, y las hojas de papel común difícilmente conservarían en forma adecuada las notas escritas. También es importante escribir con lápices semiduros o con tinta insoluble, que no se diluya con el agua.

Sería lamentable perder un diario de campo, formado tal vez durante varios años. Se recomienda, por tanto, dejarlo en el laboratorio y llevar solamente la carpeta con las hojas que se van a utilizar.

En un diario de campo debe anotarse, en primer lugar, el nombre del dueño, con su dirección completa para prevenir su devolución en caso de pérdida. Las observaciones deben llevar un orden cronológico. En la cabeza de cada hoja, el nombre de la expedición o de la institución que la patrocina. Se deben anotar cada día: la fecha, los lugares visitados, con su ubicación exacta y el desarrollo de las actividades; tipo de colecta; técnicas usadas; resultados obtenidos; observaciones referentes al hábitat; condiciones climáticas; altura sobre el nivel del mar, datos acerca del tiempo (temperatura, pH del agua, precipitación,); todo tipo de notas descriptivas útiles para el futuro. También deben anotarse los nombres de las personas participantes en la expedición (no las de una excursión escolar), así como el de las personas que han aportado alguna información importante: pescadores, guías, etc. con sus respectivas direcciones, ya que pueden ser de gran utilidad en el futuro.

El catálogo de colecta: En él se registran todas las observaciones o datos derivados de los especímenes. Sin aquellos estos no tendrían ningún valor científico.

Cada uno de nuestros ejemplares colectados (especialmente cuando se trata de plantas para herbario) debe llevar un número de colecta, que se anota en el catálogo de campo. Los números deben ser progresivos, comenzando por el primer espécimen colectado. Deben anotarse el nombre vulgar, si se conoce, la localidad exacta, medidas, la coloración natural debe tomarse de inmediato, ya que, por lo general, cambia muy pronto con la luz y con la desecación; sustrato sobre el cual crece el alga.

Actualmente la mayoría de los científicos llevan ambos tipos de información en un solo documento que corresponde al libro de campo. Tanto las observaciones de campo como los datos derivados de los especímenes pueden incluirse dentro del libro de campo, si se lleva con la debida organización y cuidado.

Para mayor información recurrir a Notas de campo de la sección de traqueofitas.

RECOLECCIÓN Y CONSERVACIÓN DE ALGAS DE AGUA DULCE

Las llamadas algas de agua dulce, no están restringidas en todas las situaciones a este medio, sino, que se presentan en los más variados ambientes continentales: superficie de suelos húmedos, lodo, arena fina de las playas, y estuarios, sobre la corteza de los árboles, epifíticas, epizoicas, a bajas temperaturas como en la nieve y en las aguas termales soportando hasta 85°C de temperatura.

Las algas de agua dulce son, por lo general, más delicadas que las marinas. Muchas especies pueden mantenerse vivas en cultivos con relativa facilidad, lo cual resulta más ventajoso para su estudio y observación que si se fijan y preservan en líquidos o se secan. En ciertas épocas del año son comunes en los charcos, lagos y en los arroyos, donde casi siempre se encuentran en las capas superficiales o semi-sumergidas.

Equipo y materiales

El material necesario para la colección de las algas de aguas dulces y continentales son los siguientes:

Frascos de vidrio de 50 o 100 cc. ó más grandes, dependiendo de las muestras; de boca ancha, con tapa de rosca, de bakelita o material inoxidable. Es preferible emplear corcho.

Bolsas de polietileno de varios tamaños. En muchos casos pueden reemplazar los frascos.

Espátula para el raspado; cucharón, pinzas, una navaja o cuchillo de hoja gruesa y punta fina.

Red de fitoplancton N° 20 ó 25

Fichas de papel resistente al agua, para anotaciones que acompañan a las muestras en la solución fijadora.

Libreta de campo para las anotaciones en el mismo lugar de colección.

Ácido acético glacial

Glicerina pura.

Solución de formol al 5% para la preservación en líquido.

Solución fijadora F. A. A. (Formol, ácido acético y alcohol).

Formol 40% 10cc.

Ácido acético glacial 5cc.

Alcohol etílico 95% 50cc.

Agua destilada 35cc.

Termómetro en grados centígrados.

Kit de medir pH.

Lupas hasta de 20 aumentos.

Trabajo de campo

Las algas se presentan en las aguas dulces de los ríos, lagos, lagunas, canales etc.; planctónicas, flotando libremente o formando grandes masas de apariencia y consistencia definidas. La colección de estas muestras se efectúa diariamente a mano, colocando los ejemplares representativos en frascos diferentes. Si se presentan constituyendo una película fina sobre las diferentes plantas acuáticas o ellas son epifíticas, debe tomarse parte de dichas plantas y más tarde en el laboratorio separar el exceso.

Para la obtención de una muestra de fondo de un ambiente de aguas tranquilas, no muy profundas, donde habitan numerosas especies microscópicas, debe usarse un cucharón común que introducido se saca con cuidado, a fin de lograr la mayor cantidad de material. Muchas algas acuáticas desarrollan sobre diferentes sustratos sumergidos: trozos de madera, roca, valvas de moluscos, ramas y raíces viejas de plantas, etc., sobre las cuales forman una capa de color y apariencia características; en estos casos, es conveniente extraer estos sustratos y efectuar un rápido examen de las partes más notorias y usando la espátula se realiza un raspado de las partes más interesantes. Igual procedimiento se efectúa en las caídas de agua, donde las algas forman costras relativamente duras, a veces presentando un aspecto mucilaginoso calcáreo.

Cuando las algas se presentan en la superficie de los suelos húmedos, lodo o en playas de arena fina cerca de las zonas de mareas, formando generalmente una película fina, se toma la capa superficial con parte del sustrato, estas porciones colocadas en los frascos son lavadas con agua, obteniéndose una concentración de algas, a veces, casi pura o una mezcla de algas y animales microscópicos.

Los especímenes acuáticos, grandes, generalmente filamentosos como *Cladophora* o subaéreos como *Trentepohlia* deben colectarse en bolsas de polietileno, así se conservan mejor por más de 24 horas.

Fitoplancton

Todos los organismos, en su mayoría microscópicos, que se encuentran suspendidos en el seno de las aguas y son arrastrados por sus movimientos constituyen el fitoplancton. El plancton existe tanto en las aguas dulces como en las marinas, y los instrumentos utilizados para su colecta se diseñan según las necesidades de cada caso. Entre los dispositivos más comunes se encuentran las redes de plancton; con ellas se puede recolectar tanto vertical como horizontalmente. Las colectas en el plano horizontal son las que se efectúan con mayor frecuencia en Biología; la profundidad a la que se sumerge la red puede controlarse por medio de cordones que se atan al dispositivo general. Al efectuar muestreos precisos, puede medirse la profundidad fijando la red sobre un cordón guía que lleva un peso determinado.

La recolección de plancton marino requiere usar redes especiales de punto fino (tela de molino), que permiten retener gran cantidad del material biológico que se halla en suspensión en el agua.

El dispositivo más simple consta de una red cónica abierta en el vértice, donde se adapta un frasco sostenido a la tela (con una ligera fuerza, una rosca metálica, etcétera).

Las redes planctónicas de tipo profesional pueden ir unidas, por su vértice, a un tubo metálico, en cuya boca tiene un mecanismo interruptor, provisto de una llave. En la parte posterior del tubo metálico se atornilla un frasco de cristal con cuello metálico; en este frasco se reciben las muestras. Otros modelos poseen un medidor de volumen de agua, con el que se puede calcular la población de organismos planctónicos por unidad de volumen.

Las muestras planctónicas de los lagos y lagunas se obtienen empleando una red de fitoplancton N° 20 ó 25. Esta red es halada superficialmente desde la orilla, o desde una

pequeña embarcación que se desplaza con cierta velocidad; el material planctónico se acumula en el frasco sujeto a la parte terminal de la red.

Cuando no se cuenta con una red fitoplanctónica, se puede improvisar una, tomando como ejemplo los coladores de café manuales que se venden en el mercado local.

Preservación

El material colectado con redes puede fijarse todo de inmediato o puede separarse en dos partes y fijar solo una porción y con el resto se procede como se explica en el siguiente párrafo. La fijación inmediata generalmente se hace con formol del 2% al 10%, con unos ml. de lugol o con líquido de Carnoy, y trasladarlo al laboratorio para su estudio, En la figura 2 se ilustra una red de plancton de diseño más o menos sencillo.

Las muestras obtenidas de otra manera, o las obtenidas con redes, se conservan en frascos de vidrio, cubiertas con suficiente agua del medio cuando son acuáticas, en otros casos, con parte del sustrato. Es conveniente recordar que no debe llenarse más de $\frac{3}{4}$ de capacidad del frasco, permitiendo así la aireación. Si los lugares de colección son cercanos al laboratorio, los frascos pueden conducirse cerrados; en cambio, si la distancia es considerable es necesario taparlos con algodón para favorecer el intercambio gaseoso y disponer de una caja de madera, plástico o cartón, con divisiones para cada uno de los frascos, al llegar al laboratorio se destapan y se agita suavemente el agua para facilitar su aireación.

Trabajo de laboratorio

Antes de proceder a la fijación del material colectado, es necesario efectuar el registro de todo lo colectado, haciendo la observación microscópica y el reconocimiento de todos los especímenes de cada muestra, su presencia se anota en orden de abundancia en el cuaderno de Colección, donde además se consignan los caracteres del hábitat, localidad, fecha y número del colector.

La fijación del material se realiza con una solución de formol al 5%, o con una solución F.A.A. (formol, ácido acético y alcohol), siendo recomendable agregar 5cc. de glicerina a cada 100 cc. de la solución fijadora para evitar la evaporación frecuente aún cuando los frascos se encuentren cerrados, Concluida la fijación los frascos se conservan convenientemente numerados, con el número de la colección general o el número particular del colector. En estas condiciones se conservan por bastante tiempo aptas para ser estudiadas en cualquier oportunidad.

Las algas conservadas en líquidos, forman parte de un herbario y en la casilla de los sobres que contiene la colección general cada género o especies está representada por una cartulina que contiene el número del colector.

Algunos autores recomiendan para las colecciones de algas azul-verdes, no dejarlas en ninguna solución, sino secarlas bien al aire libre, colocarlas en sobres de papel, los que se pegan en hojas de montaje y se guardan en el herbario. Tal procedimiento facilita el estudio posterior en vivo, porque se ha comprobado que muchas especies reviven fácilmente aún después de 15 o más años de conservación.

Si los especímenes microscópicos son interesantes y muy escasos, resulta mejor preparar montajes permanentes en solución de gelatina glicerinada:

Gelatina granulada..... 5 gr.
Fenol de cristales..... 5 gr.
Glicerina pura..... 35 cc.
Agua destilada..... 30 cc.

o jarabe Syrup (karo). El espécimen elegido debe ser fijado indistintamente en las soluciones indicadas, luego lavado en agua destilada y finalmente incluido en una mezcla de gelatina glicerinada previamente licuada. Después de la semisolidificación de la gelatina que incluye el espécimen sobre el portaobjetos, se limpia el exceso con una cuchilla, cubriendo el borde de la laminilla con una capa de esmalte de uñas incoloro, esto evita el ataque posterior de hongos en los ambientes húmedos. Los preparados definitivos y numerados adecuadamente se disponen en una caja portaláminas. La duración de estas muestras está en relación con el cuidado y el trato que se les prodiga.

Especímenes de algas filamentosas de aguas dulces, para herbario

Es común secar las algas para preservarlas. Su montaje en hojas de herbario es semejante al que se sigue para las traqueófitas (véase traqueófitas).

La técnica de montaje de las algas durante el proceso de herborización, se realiza extendiendo las algas filamentosas en una bandeja o cubeta de color claro, de aproximadamente 20 x 30 cm (mas o menos), con agua hasta la mitad, luego deslice por debajo de las algas la hoja de papel donde se vayan a montar. Sujete las algas por un extremo del papel. Saque la hoja con algas y acomódelas conforme vaya sacando la hoja. Haga esto con la ayuda de un pincel o con agujas de disección. Previo a esto no olvidar transferir los datos de colecta de cada espécimen a la hoja de herbario. La escritura debe ser hecha con lápiz grafito resistente al agua en el extremo inferior derecho de la hoja de montaje. Una vez dispuesto el espécimen a montar sobre la cartulina, éste se limpia de restos con un pincel fino y se arregla estéticamente tratando de conservarlas separadas. El alga montada en la cartulina es extraída de la bandeja, se deja escurrir el agua y luego se procede a su secado en prensa.

Para el secado y prensado del material se utiliza. un pedazo de lienzo o género delgado de trama fina colocado sobre el alga, para evitar que las algas se peguen a las hojas de papel secante, cubra la superficie expuesta de las mismas con un lienzo (trozo de tela de algodón, percal etc.). Ya que la tela puede quitarse con toda facilidad cuando los especímenes estén completamente secos, sin dañar la muestra. Encima se coloca papel toalla o absorbente, papeles de diario o secantes que permitan absorber el exceso de humedad. Se pueden intercalar cartones corrugados para proveer una adecuada circulación de aire al sistema, lo cual ayuda a acelerar el proceso de secado. Todo el conjunto se presiona firmemente entre dos tablillas de madera (prensa), como se hace con las angiospermas y se deja secar a temperatura ambiente en lugares secos y a la sombra. Después de varias horas, cambie el papel secante (que estará húmedo) y coloque uno seco. Se recomienda reemplazar los papeles una o dos veces dentro de las 24 hrs. después del montaje Después de dos días, toque las algas y si están a la temperatura ambiente y bien pegadas a la hoja de papel, la hoja de herbario estará lista y podrá guardarse con una etiqueta convenientemente preparada.

Si los especímenes al secarse no quedan fijos por sí solos a las hojas de herbario, deben pegarse o fijarse de manera semejante a como se hace con las traqueófitas.

RECOLECCIÓN Y CONSERVACIÓN DE MACROALGAS MARINAS

Las algas marinas son plantas que siempre se encuentran fijas a diversos sustratos del ambiente marino, por medio de variadas estructuras de adhesión, raras veces viven en condiciones flotantes en cierto momento de su vida como el género *Sargassum*.

Las algas marinas no se presentan en los sustratos inestables como arena o lodo, sólo las encontramos en tales medios cuando las lagunas y bahías son de aguas tranquilas o suavemente agitadas por las olas. En la zona de las mareas, las algas están confinadas al sustrato rocoso, o de naturaleza firme y medio seguro para soportar la acción mecánica de las olas.

Equipo y materiales

Se sugiere como primera regla racionalizar el equipo y materiales que se llevan a terreno, en función de las actividades y objetivos propuestos con anterioridad. De esta forma se evitará el exceso de equipaje y con ello incomodidades que dificultan el trabajo. Por ejemplo, si el área de muestreo es muy expuesta al oleaje, con mucho viento y poco accesible, es recomendable no llevar equipo de buceo, pues las posibilidades de bucear son escasas.

La zona de muestreo más rutinaria de macroalgas es la intermareal. Para muestrear en esa zona hay que contar con el vestuario apropiado. Ropas protectoras. Pantalón de buceo, short, traje de baño o jeans, dependiendo del clima, del tipo de rocas y de la geomorfología del lugar, una polera o camiseta para protegerse del viento o del sol, un sombrero para evitar el exceso de sol o gorro de lana si el lugar es ventoso y frío y traje de agua si el lugar es lluvioso. El calzado debe ser adecuado y seguro para no resbalar en las rocas. Lo más recomendable es una zapatilla con plataforma de hilo que se adhiera al sustrato o zapatillas de goma acanalada con tobilleras para evitar los frecuentes esguinces del tobillo, producidos por caídas y resbalones sobre las rocas. Se debe disponer de un buen protector solar para aplicarlo en las partes expuestas del cuerpo.

Los materiales a usar en terreno deben ser seleccionados previamente, siendo los indispensables:

Bolsas plásticas selladas para separar cada alga o muestra, en reemplazo de frascos plásticos o de vidrio que ocupan mucho espacio e incrementan el peso del equipaje.

Una bolsa de malla o "chinguillo" para transportar las bolsas más pequeñas o algas recolectadas.

Espátulas de acero o cuchillo de pescados para extraer algas crustosas que se adhieren firmemente a las rocas.

Fijadores y preservantes químicos: formol comercial al 40-37% para preparar la solución al 5% con agua de mar.

Para transportar el material al laboratorio, se requerirá de una caja aislante, con sus congelantes incluidos si se quiere transportar algas vivas, o bien, bidones o contenedores plásticos resistentes (tanques de 5 galones con tapa).

Para herborizar las algas en terreno se necesitará una bandeja, de color claro en lo posible, para extender las muestras.

Una prensa de herbario (puede ser un poco mas pequeña que la usada para las traqueofitas) con cartones, secantes o papel periódico, hojas de montaje de tamaño adecuado, lienzos de algodón, percal u otro material, de tamaños diferentes.

Libreta de campo para tomar anotaciones del lugar, lápices grafito y lápices de tinta resistente al agua. La libreta de campo puede ser una libreta común, tipo cuaderno pequeño.

Una tabla de acrílico, la cual tiene la ventaja de que puede mojarse sin que se borre la escritura, o bien para mayor comodidad, puede remplazarse con una grabadora portátil, debidamente protegida.

Dónde colectar

La colección de macroalgas puede realizarse tanto en la zona intermareal (zona de la costa expuesta al movimiento de las mareas) como en la zona submareal (parte sumergida de la costa). En esta última, el muestreo en profundidad estará limitado por la distribución de las algas la cual dependerá de la profundidad de penetración de la luz solar.

Muestreo intermareal: la colecta de algas intermareales se realiza en forma manual y en las horas de baja marea. Se recomienda realizar la recolección por lo menos una hora antes de la hora de baja marea (consultar tablas de mareas previamente), y desde la zona más alta del intermareal. Los especímenes varados deben obtenerse al finalizar el muestreo. Estas algas, por lo general, se encuentran en las zonas más bajas de los roqueríos y playas o en el submareal somero y pueden ser recolectadas en su hábitat natural si se espera que la marea baje completamente. De esta forma se asegura la recolección de material fresco y no deteriorado a causa del desprendimiento.

Finalmente es importante recordar, que luego de la colecta, se debe anotar en la libreta de campo el nombre y características del lugar así como la distribución vertical de los cinturones de algas.

Muestreo submareal: la recolección de microalgas en la zona submareal requiere de métodos y técnicas complejas. El método más frecuente del que se obtiene los mejores resultados, es el buceo. El colector debe tener el entrenamiento necesario que lo acredite como buceador (certificado de Buzo Profesional).

Otro método utilizado en la colecta de algas de profundidad se implementa mediante el uso de rastra o una draga, que son instrumentos empleados en la recolección de bentos submareal. La desventaja de estos métodos en relación al buceo, es que las algas se obtienen en forma incompleta y muchas veces destrozadas, además se omiten datos importantes de la colecta, como tipo de sustrato donde crecen, profundidad exacta, etc. En la recolección de algas de profundidad mediante la técnica del buceo deben tenerse en cuenta las siguientes recomendaciones: la colecta de macroalga debe iniciarse a partir de profundidades mayores, en las horas de baja marea y en buenas condiciones del mar. Es importante, además, respetar en forma estricta, las normas y reglas del buceo, sin cometer imprudencias que pongan en peligro la integridad física del buzo.

Entre estas normas se incluyen las siguientes: en toda actividad o maniobra de buceo deben intervenir al menos dos buzos. Si el muestreo submareal se va a realizar lejos de

la costa, es necesario contar con un bote rápido y liviano como plataforma de apoyo al buceo.

En el muestreo tanto de algas intermareales como submareales, se recomienda realizar los máximos esfuerzos en la recolección de material fértil. Los caracteres reproductivos son de valor taxonómico para la identificación de las algas, de manera que es importante para el colector saber reconocer en el terreno este tipo de material. Por otra parte, es conocido el hecho de que existen algas que crecen como epífitas, es decir, utilizan como sustrato otras algas de mayor tamaño. La mayoría de estas algas epífitas son pequeñas e inconspicuas y frecuentemente inadvertidas para el colector o son depositadas junto con otras algas. En este caso lo más probable es que ellas no aparezcan posteriormente al separar las muestras en el laboratorio. Frente a esta situación se recomienda guardar las algas epífitas y las de pequeño tamaño en depósitos separados, (bolsas o frascos pequeños) y en lo posible conservar trozos del huésped o sustrato. Finalmente se sugiere colectar las algas completas, es decir incluyendo todas las partes del talo, especialmente la porción rizoidal o disco de fijación (exceptuando aquellos especímenes de gran tamaño, a menos que se sospeche que se trata de una nueva especie o una variante morfológica). El disco de fijación es un carácter importante a considerar en la taxonomía de algunos taxa.

Procesamiento de las muestras: preparación y formación de colecciones

En el terreno

Luego de la recolección, el material puede ser procesado en terreno. Para ello se sugiere realizar una clasificación primaria o gruesa, separando y agrupando las algas por las formas más parecidas. Esto es relativamente fácil de lograr cuando se trabaja con algas frescas. Las tonalidades de color, especialmente en las algas rojas son diferentes y este carácter, unido a la morfología, facilita esta primera clasificación. Si el colector está familiarizado con la flora del lugar, esta actividad resulta rápida y sencilla. Una vez clasificado y separado el material por especie o categoría más alta, hay que decidir cómo procesar las muestras para su transporte al laboratorio. Se pueden transportar frescas, fijadas en algún preservante químico, o bien secas, herborizadas.

Si alguna especie en particular se va a utilizar para estudiar su ciclo de vida u otros aspectos de su biología en el laboratorio, el material debe ser conservado y transportado vivo, asegurando las condiciones para que éste sobreviva al transporte. Para realizar análisis moleculares se recomienda deshidratar y conservar las algas en sílica gel o herborizarlas en forma inmediata a su extracción. Para estudios morfológicos, lo más recomendable es fijar o herborizar el material en forma inmediata a su recolección. Aunque también puede ser transportado fresco para ser posteriormente congelado en un freezer o refrigerador.

Si se decide fijar el material, cada alga debe ser introducida en una bolsa plástica adecuada al tamaño del espécimen, agregando de inmediato el líquido fijador. El fijador químico de uso generalizado para estudios morfológicos de macroalgas es la formalina (=formaldehído 37 o 38% ó 100% formalina comercial). La formalina se utiliza en forma diluida y a distintos grados de concentración según el organismo a fijar. Para fijar macroalgas, ésta se diluye en agua de mar y, por lo general, se prepara diluida al 10% para algas corticadas, y al 5% para algas más delicadas.

Para preparar, por ejemplo, un litro de solución al 6%, debemos diluir 162 ml de formalina en agua de mar, hasta completar un litro, esto de acuerdo con la siguiente relación:

$$V_1 \times C_1 = V_2 \times C_2$$

V_1 = Volumen de formalina comercial

C_1 = Concentración de formalina comercial

V_2 = Volumen de formalina a preparar

C_2 = Concentración de formalina a preparar

$$V_1 \times 37\% = 1.000 \text{ ml} \times 6\%$$

$$V_1 = \frac{1.000 \text{ ml} \times 6\%}{37\%}$$

$$V_1 = 162 \text{ ml}$$

En caso de algas de talo demasiado delgado y frágil, puede utilizarse como fijador alcohol al 30%. El uso de uno u otro fijador depende de las ventajas y desventajas que cada uno de ellos ofrece al investigador y a la investigación para la cual se requiere el material. El alcohol es de mayor costo, se necesita en mayor cantidad que la formalina, extrae los pigmentos de las algas con mucha facilidad y produce daño celular; sin embargo no es perjudicial para quien lo manipula. La formalina es de menor costo, se usa en menor cantidad, no extrae los pigmentos de las algas y no produce daño a las células, conservando muy bien su estado natural. Este fijador, sin embargo, es altamente dañino, produce irritaciones a la piel y ojos y es potencialmente cancerígeno. La formalina de mala calidad precipita y se acidifica. En condiciones ácidas, este fijador forma un **éter de bisclorometil que es un compuesto comprobadamente cancerígeno**. Por esta razón se recomienda agregar a este tipo de formalina, unos gramos de borax para neutralizar el pH, evitando así su rápida acidificación. A pesar de que la manipulación de la formalina es riesgosa, continúa siendo el fijador más recomendable o que más ventajas ofrece como método de conservación de macroalgas.

Una vez fijado el material, se debe rotular cada muestra. Para ello, se sugiere usar un lápiz marcador con tinta resistente al agua y colocar los siguientes datos: fecha de colecta, localidad y nombre de la especie. Estos datos son transferidos a la libreta de campo. El material fijado debe ser trasladado al laboratorio en contenedores plásticos herméticamente cerrados para evitar derrame y desprendimiento de olores irritantes. Para alivianar las muestras, muchas veces se hace necesario eliminar el fijador, lo que no ocasiona daño ni perjuicio al material.

En el laboratorio

Una vez en el laboratorio, el material fresco y fijado debe ser tratado nuevamente para el montaje y conservación de especímenes testigos. Las algas transportadas frescas pueden ser inmediatamente montadas en hojas de herbario, fijadas en alcohol o formalina o simplemente se les puede conservar congeladas para posterior y definitivo tratamiento de preservación. Los especímenes que fueron fijados previamente en terreno pueden ser conservados en fijadores líquidos y depositados en frascos de plástico o de vidrio formando así una colección de algas preservadas en líquido. Pueden también ser herborizadas para constituir una colección de algas secas o herbario.

Si se conservan fijadas, se recomienda reemplazar el fijador utilizado en terreno por nuevo fijador. Cuando la fijación se ha realizado en formalina al 10% ésta debe ser reemplazada por formalina al 5%. En el caso de haber fijado las algas con alcohol puede mantenerse el mismo fijador o bien renovarlo. Con el fin de evitar la rápida evaporación de los líquidos fijadores, se sugiere agregar sobre ellos algunos ml de glicerina líquida.

La técnica de herborización de las algas frescas o fijadas previamente en el terreno es básicamente la misma. Sin embargo cuando el material viene fijado desde el terreno se sugiere lavarlo primero en agua corriente si está formalizado o en una solución de agua alcohol 1:1 si éste se ha fijado previamente en alcohol, antes de proceder a su separación y montaje. La separación debe iniciarse por los especímenes de mayor tamaño dispuestos sobre una bandeja de color claro con agua de mar, seleccionando con especial cuidado el material con estructuras reproductivas. La clasificación gruesa de cada especie realizada con anterioridad, debe ser chequeada en el laboratorio bajo lupa o microscopio. Una vez separado el material por especie, (si esto no se ha hecho previamente en el terreno), se deben elegir los mejores y más completos especímenes para ser herborizados.

La técnica de montaje de las algas durante el proceso de herborización, se realiza extendiendo el material en una bandeja con agua de mar, haciendo pasar enseguida bajo éste una hoja de montaje, adecuada al tamaño del alga. Previo a esto no olvidar transferir los datos de colecta de cada espécimen a la hoja de herbario. La escritura debe ser hecha con lápiz grafito en el extremo inferior derecho de la hoja de montaje. Una vez dispuesto el espécimen a montar sobre la cartulina, éste se limpia de restos de arena y otros elementos con un pincel fino y se arregla estéticamente tratando de conservar fielmente su morfología y aspecto natural. El alga montada en la cartulina es extraída de la bandeja, se deja escurrir el agua y luego se procede a su secado en prensa. Las formas muy delicadas de algas marinas pueden acomodarse y fijarse sobre hojas de herbario de la misma manera que las filamentosas de agua dulce.

Para el secado y prensado del material se utiliza un pedazo de lienzo o género delgado de trama fina colocado sobre el alga, y encima el papel o toalla absorbente y una cantidad apropiada de género, papeles de diario y secantes que permitan absorber el exceso de humedad. Se pueden intercalar cartones corrugados para proveer una adecuada circulación de aire al sistema, lo cual ayuda a acelerar el proceso de secado. Todo el conjunto se presiona firmemente entre dos tablillas de madera (prensa), como se hace con las angiospermas y se deja secar a temperatura ambiente en lugares secos y a la sombra. El tiempo de secado de las algas es de tres a siete días. Se recomienda reemplazar los lienzos y papeles una o dos veces dentro de las 24 hrs. Después del montaje, para luego continuar el recambio de manera más espaciada en el tiempo.

Terminado el proceso de secado, cada espécimen montado en la hoja de cartulina es pegado a una hoja de herbario tamaño estándar (45 cm x 25 cm), la que puede protegerse con una cubierta de papel hilado blanco 2 cm más ancha que la hoja de herbario, confeccionando de esta manera una carpeta de herbario.

Algunas algas deben ser tratadas en forma especial durante su proceso de conservación en seco. Tal es el caso de algunas algas rojas calcáreas, especialmente aquellas pertenecientes a la familia Corallinaceae. Estas algas, tanto las formas crustosas como

articuladas, son extremadamente frágiles y es conveniente secarlas al aire libre sin herborizarlas. Las coralináceas articuladas pueden ser remojadas durante una semana en una solución de glicerina al 30% o 50% (con fenol o formalina para evitar crecimiento de bacterias y hongos) en la oscuridad, antes de ser secadas a temperatura ambiente (Womersley, 1984). Este tratamiento evita la destrucción o quiebre del talo. Una vez secas, estas algas pueden ser depositadas en sobres que posteriormente se pegan a una hoja de herbario tamaño estándar.

Las algas de gran tamaño también requieren de un tratamiento especial para su conservación. En general, si se quiere conservar el espécimen completo, es mejor fijarlo en formalina y depositarlo en contenedores de gran tamaño. Otra alternativa es herborizar y conservar en hoja de herbario algunas partes del talo, como por ejemplo trozos de filoides, áreas reproductivas, disco de fijación o parte basal, incorporando además una fotografía del espécimen.

Cuando se requiere preservar especímenes de gran tamaño, como por ejemplo algas pardas del tipo de las Laminariales o Durvilleales, para exhibirlo en una muestra museal o para fines didácticos, se recomienda remojar el material una vez extraído de su medio en una solución de glicerina al 30% o 50% (agregando unos gramos de fenol o ml. De formalina como preservante) por una semana y en un lugar oscuro y luego secarlo durante una semana. Este tratamiento permite obtener un espécimen apropiado para su examen y manipulación, sin el olor irritante del fijador.

Organización de un herbario

Un herbario es un conjunto o colección de plantas secas. Una colección de algas secas puede ser entonces la base material de un herbario. Algunos le llaman también algario. La colecta, preservación y montaje de algas secas conducirá a la formación de un herbario. Esta colección constituye una base de datos o una fuente de información valiosa que debe estar debidamente organizada para ser entregada a los especialistas que la requieran. La colección necesita ser depositada en muebles adecuados y en sala especial de herbario. La sala de herbario debe ser oscura y sin humedad. Los muebles de colección pueden ser de madera o bien metálicos. Se recomienda de preferencia el uso de muebles metálicos, de color oscuro y con un número de compartimientos que permitan disponer carpetas de herbario en forma extendida y holgada.

Cada hoja o carpeta de herbario incluyendo una especie determinada debe ser numerada. Este número es correlativo y se coloca en el extremo superior derecho de la hoja. Además del número, la hoja de herbario debe llevar también una etiqueta de identificación del espécimen, la que va pegada en el extremo inferior derecho de la hoja. La etiqueta debe contener como datos mínimos: el nombre del herbario o de la colección específica y de la institución a que pertenece, el nombre científico de la especie, nombre y ubicación geográfica de la localidad o lugar de colecta, nombre del colector y fecha de la colecta donde se indique en forma clara y completa, día, mes y año. Agregar, si se estima conveniente antecedentes sobre el hábitat y nicho ecológico de la especie y algunas observaciones específicas, como el estado reproductivo u otras. Las carpetas con especies pertenecientes al mismo género pueden incluirse dentro de una carpeta más grande y ordenarse alfabéticamente. Por encima de este nivel, los géneros pueden ser clasificados dentro de sus niveles taxonómicos superiores, Familia, Orden, Clase, División. Cada uno de estos niveles a su vez puede ser ordenado en el

herbario por orden alfabético o sistemáticamente, siguiendo algún sistema de clasificación para el grupo o División.

Materiales específicos requeridos para la confección de un herbario de algas

Cartulina blanca N° 801 para montaje de las algas.

Cartulina extra blanca N° 935 (Cartón forrado). Para hoja de herbario tamaño estándar.

Papel hilado blanco N° 002, para cubierta de la hoja de herbario.

Cartulina blanca N° 801 para carpetas ordenadas por niveles taxonómicos.

Papel blanco para confección de etiquetas.

Cuando una colección de algas pasa a constituir un herbario organizado y adquiere relevancia debe ser registrado internacionalmente, para conocimiento de la comunidad científica.

¿Cómo inscribir un herbario?

El procedimiento es simple, basta enviar una carta-solicitud dirigida al editor del libro "INDEX HERBARIORUM", referido a informar sobre los herbarios y colecciones de todo el mundo. El solicitante deberá especificar en la carta lo siguiente: valor científico de la colección, volumen o tamaño de esta y el objetivo e interés de que esa colección sea indexada y registrada en ese libro. El editor le indicará acerca de algún otro requisito específico a cumplir para ser incluido en su libro. El editor de la última edición de este libro, compilado por los autores, P.Holmgren, W Keuken & E. K. Schofield es el Dr. F. A. Stafleu, cuya dirección es: Institute of Systematic Botany, Heidelberglaan 2, P.O. Box 80.102, 3508 TC Utrecht, NETHERLANDS. (Holanda).

IDENTIFICACIÓN DEL MATERIAL

Una vez montados los especímenes en una hoja de herbario o conservados en líquido fijador, éstos deben ser identificados a algún nivel taxonómico. La identificación se puede dar en diversos momentos, desde la recolección en campo hasta antes o después de la generación de etiquetas. Para ello es necesario contar con alguna literatura básica como una flora de la localidad o del área geográfica de donde proviene el material colectado. Sin duda esto ayudará bastante en un primer intento por lograr una identificación taxonómica gruesa o primaria de los especímenes. Si el tratamiento de esa flora cuenta con ilustraciones de las especies esto facilitará el procedimiento. Para ello basta con observar y comparar el hábito del espécimen montado con las ilustraciones del hábito de las especies que figuran en la literatura. El uso efectivo de la literatura requiere sin embargo de un conocimiento básico de las algas marinas. Sólo de esta forma el estudioso de esa colección se podrá ubicar de manera rápida en el grupo mayor o División de alga a la que pertenece el espécimen bajo estudio, continuando así con la identificación de este a otros niveles taxonómicos como familia, género y especie. La mayoría de los tratados sobre floras regionales o de países cuentan con claves taxonómicas a nivel de cada grupo mayor o División y a otros niveles menores, facilitando enormemente el procedimiento de identificación. Para tener mejores posibilidades en la clasificación de los especímenes de la colección, es recomendable tener material tanto herborizado como preservado en líquido fijador. Generalmente el material seco, montado en una hoja de herbario es útil para observar aspectos como el

tamaño, color, hábito, variación morfológica del ejemplar bajo identificación. Por otra parte el material preservado en líquido conserva la estructura de las células tanto vegetativas como reproductivas, permitiendo así obtener antecedentes valiosos de la morfología de las algas, lo que eventualmente conducirá a una identificación más fina y precisa. Para observar y estudiar la anatomía interna del talo de las algas se deben realizar preparaciones microscópicas de cortes histológicos de las algas, utilizando para ello diversas técnicas que incluyen cortes tanto longitudinales, transversales o periclinales del tallo junto con tinciones celulares específicas, según sea la o las estructuras de las células o del talo que se requiera observar.

Los cortes histológicos pueden realizarse manualmente mediante una hoja de afeitar o bien para cortes más delgados se recomienda utilizar un micrótopo. La técnica del corte manual mediante el empleo de una hoja de afeitar en general es variada pero simple, requiriendo solo un poco de paciencia y práctica. Uno de los procedimientos más exitosos consiste en secar el trozo de alga a cortar sobre un portaobjeto colocado sobre la pantalla metálica de una lámpara de escritorio hasta darle una consistencia adecuada que permita ser cortado con facilidad sin que la hoja de afeitar resbale por efecto del mucílago del alga. Es importante que la hoja de afeitar tenga un buen filo y en lo posible que sea de acero inoxidable. Para realizar el corte, el trozo seco de alga se coloca bajo la lupa y se afirma en su extremo opuesto con pinza o con el dedo, procediendo finalmente a cortar con seguridad y firmeza. Para realizar buenas observaciones de la morfología de las algas es recomendable teñir los cortes empleando tinciones celulares. El colorante más utilizado en la actualidad para teñir las células de las algas es la anilina azul, el cual tiñe muy bien el protoplasma. Como medio de montaje para obtener preparaciones microscópicas permanentes se usa una miel de maíz conocida en el comercio como syrup (KARO), encontrada con facilidad en algunos supermercados. La siguiente receta puede ser usada, removiendo y agregando las soluciones con finas pipetas sobre el corte a teñir dispuesto en un portaobjetos.

Técnica para teñir cortes de algas con anilina azul (Anilina blue) (Womersley, 1984, modificado)

1. Colocar sobre el trozo de alga unas gotas de anilina azul al 1% por cinco minutos.
2. Acidificar con una gota o dos de HCl 1N.
3. Lavar con agua destilada para extraer el exceso de tinción y los restos de ácido.
4. Agregar unas gotas de syrup (karo) al 30% por 2 a 10 minutos.
5. Reemplazar por karo el 50% otros 2 a 10 minutos.
6. Reemplazar con karo al 80% por otros 2 a 10 minutos.
7. Colocar cuidadosamente un cubreobjeto sobre el preparado.

Es recomendable cuidar que no queden burbujas por efecto de la evaporación del medio de montaje. Para evitarlo, revise por dos o tres días consecutivos el estado del preparado. Deje la preparación sobre una superficie plana y en ambiente temperado hasta que seque completamente. Una vez seca, proceda a sellar la preparación con esmalte de uñas incoloro.

Existe una serie y variada gama de técnicas microscópicas especializadas que son requeridas para determinados y detallados estudios de las algas cuyo análisis o comentario escapan el objetivo principal de este trabajo.

Si el investigador requiere de alguna de estas técnicas, deberá recurrir a alguno de los tratados especiales sobre microtécnicas.

Para mayor información sobre la identificación del material se recomienda leer la sección dedicada a la identificación de las traqueofitas (pág. ¿?).

REFERENCIAS

- Acleto O. C. y R. Zúñiga. 1998. Introducción a las algas. Editorial Escuela Nueva S. A. Lima- Perú. Pp383.
- Alveal, K., M. S. Ferrario, E. C. Oliveira y F. Sar (eds). 1995. Manual de métodos ficológicos. Universidad de Concepción. Concepción, Chile.
- De La Torre, G. G., C. Juárez López, H. H. Figueroa Tapia. 1992. Técnicas Biológicas Selectas de Laboratorio y de Campo. Editorial Limusa. Mexico.
- Holmgren, P., W. Keuken & E. Schofield, 1981. Index Herbariorum. Part I The Herbaria of the World. 7 th Edition. F. A. Stafleu (ed.).
- Litter M. M. & D. Litter, 1985. Ecological Field methods: macroalgae. In: M.M. Litter & D. Litter (eds.). Handbook of Phycological Methods: 68-86.
- Womersley, H. B. S., 1984. The marine benthic flora of Southern Australia. Government Printing Division Part I: 329.