

FICOLOGÍA

GUÍA DE TRABAJOS PRÁCTICOS

-2015-

ÍNDICE

	P.
ALGUNAS REGLAS BÁSICAS DE HIGIENE Y SEGURIDAD EN LABORATORIOS	3
USO Y CUIDADO DEL MICROSCOPIO	9
APÉNDICE I: CALIBRACIÓN DEL MICROSCOPIO	10
PROGRAMA ANALÍTICO DE FICOLOGÍA	11
REGIMEN DEL CURSO	14

TRABAJOS PRÁCTICOS	
1. Técnicas de aislamiento y cultivo de microalgas.	15
Apéndice I de medios de cultivo	19
2. Estimación de la tasa de crecimiento en cultivos de microalgas por recuento celular.	21
3. La vacuola contráctil como organela osmoregulatoria	28
4. Adaptación cromática.	31
5. Movilidad en algas (tropismos)	34
6. Cubiertas celulares	37
7. Fosfatasa alcalina extracelular	41
8. Diazotrofia	46
9. Las algas como bioindicadores.	47
Apéndice II Calibración de microscopios	50
Apéndice III Tabla de valores de IDP para especies de diatomeas pampeanas	
10. Diversidad y sistemática algal	53

ALGUNAS REGLAS BÁSICAS DE HIGIENE Y SEGURIDAD EN LABORATORIOS

Las medidas de Seguridad en Laboratorios son un conjunto de medidas preventivas destinadas a proteger la salud de los que allí se desempeñan frente a los riesgos propios derivados de la actividad, para evitar accidentes y contaminaciones tanto dentro de su ámbito de trabajo, como hacia el exterior.

Las reglas básicas aquí indicadas son un conjunto de prácticas de sentido común realizadas en forma rutinaria.

El elemento clave es la actitud proactiva hacia la seguridad y la información que permita reconocer y combatir los riesgos presentes en el laboratorio. Será fundamental la realización meticulosa de cada técnica, pues ninguna medida, ni siquiera un equipo excelente puede sustituir el orden y el cuidado con que se trabaja.

1. Se deberá conocer la ubicación de los elementos de seguridad en el lugar de trabajo, tales como: matafuegos, salidas de emergencia, mantas ignífugas, lavajos, gabinete para contener derrames, accionamiento de alarmas, etc.
2. No se permitirá comer, beber, fumar o maquillarse.
3. No se deberán guardar alimentos en el laboratorio, ni en las heladeras que contengan drogas.
4. Se deberá utilizar vestimenta apropiada para realizar trabajos de laboratorio y cabello recogido (guardapolvo preferentemente de algodón y de mangas largas, zapatos cerrados, evitando el uso de accesorios colgantes).
5. Es imprescindible mantener el orden y la limpieza. Cada persona es responsable directa de la zona que le ha sido asignada y de todos los lugares comunes.
6. Las manos deben lavarse cuidadosamente después de cualquier manipulación de laboratorio y antes de retirarse del mismo.
7. Se deberán utilizar guantes apropiados para evitar el contacto con sustancias química o material biológico. Toda persona cuyos guantes se encuentren contaminados no deberá tocar objetos, ni superficies, tales como: teléfono, lapiceras, manijas de cajones o puertas, cuadernos, etc.

8. No se permitirá pipetear con la boca.
9. No se permitirá correr en los laboratorios.
10. Siempre que sea necesario proteger los ojos y la cara de salpicaduras o impactos se utilizarán anteojos de seguridad, viseras o pantallas faciales u otros dispositivos de protección. Cuando se manipulen productos químicos que emitan vapores o puedan provocar proyecciones, se evitará el uso de lentes de contacto.
11. No se deben bloquear las rutas de escape o pasillos con equipos, máquinas u otros elementos que entorpezcan la correcta circulación.
12. Todo material corrosivo, tóxico, inflamable, oxidante, radiactivo, explosivo o nocivo deberá estar adecuadamente etiquetado.
13. No se permitirán instalaciones eléctricas precarias o provisorias. Se dará aviso inmediato a la Secretaría Técnica en caso de filtraciones o goteras que puedan afectar las instalaciones o equipos y puedan provocar incendios por cortocircuitos (Interno 355).
14. Se requerirá el uso de mascarillas descartables cuando exista riesgo de producción de aerosoles (mezcla de partículas en medio líquido) o polvos, durante operaciones de pesada de sustancias tóxicas o biopatógenas, apertura de recipientes con cultivos después de agitación, etc.
15. Las prácticas que produzcan gases, vapores, humos o partículas, aquellas que pueden ser riesgosas por inhalación deben llevarse a cabo bajo campana.
16. Se deberá verificar la ausencia de vapores inflamables antes de encender una fuente de ignición. No se operará con materiales inflamables o solventes sobre llama directa o cerca de ella. Para calentamiento, sólo se utilizarán resistencias eléctricas o planchas calefactoras blindadas. Se prestará especial atención al punto de inflamación y de autoignición del producto.
17. El material de vidrio roto no se depositará con los residuos comunes. Será conveniente ubicarlo en cajas resistentes, envuelto en papel y dentro de bolsas plásticas. El que sea necesario reparar se entregará limpio al taller.
18. Será necesario que todo recipiente que hubiera contenido material inflamable, y deba ser descartado sea vaciado totalmente, escurrido, enjuagado con un solvente apropiado y luego con agua varias veces.

19. Está prohibido descartar líquidos inflamables o tóxicos o corrosivos o material biológico por los desagües de las piletas, sanitarios o recipientes comunes para residuos. En cada caso se deberán seguir los procedimientos establecidos para la gestión de residuos. Consultar al Servicio de Higiene y Seguridad (Interno 275).
20. Cuando sea necesario manipular grandes cantidades de materiales inflamables (más de 5 litros.) deberá tenerse a mano un extintor apropiado para ese material en cuestión.
21. Cuando se trasvase material combustible o inflamable de un tambor a un recipiente más pequeño, realice una conexión con una cadena del tambor a tierra y con otra entre el tambor y el recipiente de manera de igualar potenciales y eliminar la posible carga estática.
22. Al almacenar sustancias químicas considere que hay cierto número de ellas que son incompatibles pues almacenadas juntas pueden dar lugar a reacciones peligrosas. Ante dudas consultar al Servicio de Higiene y Seguridad (Interno 275).
23. No almacene en estantes sobre mesadas sustancias corrosivas, hágalo en estantes bajo mesadas y en caso de ácidos o álcalis concentrados (mayor de 2N) deben ser mantenidas dentro de lo posible en bandejas de material adecuado.
24. Los cilindros de gases comprimidos y licuados deben asegurarse en posición vertical con pinzas, grampas y correas o cadenas a la pared en sitios de poca circulación, protegidos de la humedad y fuentes de calor, de ser posible en el exterior.
25. Los laboratorios contarán con un botiquín de primeros auxilios con los elementos indispensables para atender casos de emergencia.
26. Se informará al Dpto. de Seguridad y Control cuando se necesiten dejar equipos funcionando en ausencia del personal del laboratorio.
27. Se anotará en un lugar visible desde el exterior los teléfonos de los responsables de cada laboratorio para que puedan ser consultados en caso de alguna anomalía verificada por el personal de Seguridad y Control en su recorrida fuera de los horarios habituales de trabajo.

Procedimientos ante emergencias:

- Emergencias médicas

Si ocurre una emergencia tal como: cortes o abrasiones, quemaduras o ingestión accidental de algún producto químico, tóxico o peligroso, se deberá proceder:

1. A los accidentados se les proveerán los primeros auxilios.
2. Simultáneamente se tomará contacto con el Servicio Médico (Interno 482), o al Servicio Médico de Deportes (784-4351 / 3948)
3. Avise al Jefe de Laboratorio o autoridad del Departamento, quienes solicitarán asistencia de la Secretaría Técnica (interno 380) para que envíen personal del Dpto. de Mantenimiento, Seguridad y Control o Servicios Generales según correspondan.
4. El Jefe de Departamento notificará el accidente al Servicio de Higiene y Seguridad para su evaluación e informe, donde se determinarán las causas y se elaborarán las propuestas para modificar dichas causas y evitar futuras repeticiones.
5. Centros para requerir ayuda médica:

S.A.M.E. Teléfono 107

Hospital Pirovano

Av. Monroe 3555 Tel. 542-5552 / 9279

INTOXICACIONES:

Hospital de Niños. Dr. R. Gutiérrez

Sánchez de Bustamante 1399. Capital Federal. Tel: 962-6666.

Hospital de Niños. Dr. P. de Elizalde

Av. Montes de Oca 40 Tel. 307-7491 Toxicología 300-2115

QUEMADURAS:

Hospital de Quemados

P. Goyena 369 Tel. 923-4082 / 3022

OFTALMOLOGÍA

Hospital Santa Lucía

San Juan 2021 Tel. 941-7077
Hospital Dr. P. Lagleyze
Av. Juan B. Justo 4151 Tel. 581-0645 / 2792

- Incendio:

1. **Mantenga la calma.** Lo más importante es ponerse a salvo y dar aviso a los demás.
2. Si hay **alarma, acciónela.** Si no grite para alertar al resto.
3. **Se dará aviso inmediatamente** al Dpto. de Seguridad y Control (Interno 311) informando el lugar y las características del siniestro.
4. Si el fuego es pequeño y sabe utilizar un extintor, **úselo.** Si el fuego es de consideración, no se arriesgue y manteniendo la calma ponga en marcha el plan de evacuación.
5. Si debe evacuar el sector apague los equipos eléctricos y cierre las llaves de gas y ventanas.
6. Evacue la zona por la ruta asignada.
7. No corra, camine rápido, cerrando a su paso la mayor cantidad de puertas. No utilice ascensores. Descienda siempre que sea posible.
8. No lleve consigo objetos, pueden entorpecer su salida.
9. **Si pudo salir, por ninguna causa vuelva a entrar.** Deje que los equipos especializados se encarguen.

- Teléfonos útiles

BOMBEROS Teléfono 100

DIVISIÓN CENTRAL DE ALARMA: 381-2222 / 383-2222 / 304-2222.

CUARTEL V DE BELGRANO:

Obligado 2254 Capital Tel. 783-2222

BOMBEROS DE VICENTE LÓPEZ

Av. Maipú 1669 Vicente López. Tel. 795-2222

BOMBEROS DE SAN ISIDRO:

Santa Fe 650 Martínez. Tel. 747-2222

- Derrame de productos químicos

1. Atender a cualquier persona que pueda haber sido afectada.
2. Notificar a las personas que se encuentren en las áreas cercanas acerca del derrame.
Coloque la cinta de demarcación para advertir el peligro.
3. Evacuar a toda persona no esencial del área del derrame.
4. Si el derrame es de material inflamable, apagar las fuentes de ignición, y las fuentes de calor.
5. Evite respirar los vapores del material derramado, si es necesario utilizar una máscara respiratoria con filtros apropiados al tipo de derrame.
6. Ventilar la zona.
7. Utilizar los elementos de protección personal tales como equipo de ropa resistente a ácidos, bases y solventes orgánicos y guantes.
8. Confinar o contener el derrame, evitando que se extienda. Para ello extender los cordones en el contorno del derrame.
9. Luego absorber con los paños sobre el derrame.
10. Deje actuar y luego recoger con pala y colocar el residuo en la bolsa roja y ciérrela.
11. Comuníquese con el Servicio de Higiene y Seguridad para disponer la bolsa con los residuos.
12. Si el derrame es de algún elemento muy volátil deje dentro de la campana hasta que lo retire para su disposición.
13. Lave el área del derrame con agua y jabón. Seque bien.
14. Cuidadosamente retire y limpie todos los elementos que puedan haber sido salpicados por el derrame.
15. Lave los guantes, la máscara y ropa.

CUPÓN PARA ENTREGAR AL DOCENTE

Fecha:

El /La alumno/a.....

de la materia.....

ha leído minuciosamente la guía de Normas Mínimas de Seguridad que acompaña esta guía.-----

USO Y CUIDADO DEL MICROSCOPIO

1. Si es necesario traslade el microscopio con sumo cuidado hasta la mesada de trabajo tomándolo de la columna con una mano y sujetando la base del mismo con la otra mano.
2. Quite la funda.
3. Encienda el microscopio.
4. Coloque el preparado en la platina.
5. Aumente la intensidad lumínica.
6. Enfoque con el objetivo de menor aumento.
7. Pase a otros aumentos colocando la mano sobre el revólver, **NO** sobre los objetivos.
8. Cuando necesite observar con el objetivo de inmersión (100x), coloque una pequeña gota de aceite sobre el cubreobjetos.
9. Si necesita cambiar la zona de enfoque rote el revólver en sentido inverso (de 100x a 4x y luego a 10x) **sin pasar por el objetivo de 40x**.
10. Cuando cambie el preparado o bien no va a continuar observando por un breve tiempo, baje la intensidad lumínica y apague el microscopio. De ser necesario comience nuevamente por el paso 3.
11. Una vez finalizada la observación y antes de retirarse del laboratorio asegúrese de:
 - a) Ajustar el tornillo de los oculares si lo utilizó.
 - b) Rotar el revólver dejándolo centrado en el objetivo de menor aumento.
 - c) Limpiar el objetivo de 100x quitando el aceite con el papel especial para lentes (papel arroz). Si requiere de una limpieza más profunda, embeba el papel arroz con una solución de 70% de éter etílico y 30% de alcohol etílico.
 - d) Limpiar la platina.
 - e) Dejar abierto el diafragma.
 - f) Bajar la intensidad lumínica.
 - g) Apagar y desenchufar el microscopio.
 - h) Cubrir el microscopio con su funda antipolvo.
 - i) Trasladar el microscopio a su ubicación con sumo cuidado.

CUPÓN PARA ENTREGAR AL DOCENTE

Fecha:

El /La alumno/a.....
de la materia. **FICOLOGÍA**.....
ha leído minuciosamente las Normas de Uso y Cuidado del Microscopio que acompañan esta guía. -----

APÉNDICE I

CALIBRACIÓN DE MICROSCOPIOS

Las dimensiones de la células y de las diferentes estructuras que estas pueden presentar (espinas, sedas, brazos u otras ornamentaciones) es un dato relevante para la determinación de las algas a nivel específico e infraespecífico. En el caso de trabajar con organismos microscópicos, las mediciones deben realizarse con un **ocular graduado** (o **micrométrico**). Este es un ocular enfocable, que posee una escala dividida en forma arbitraria, por lo que debe ser calibrado a fin de conocer, para cada aumento (es decir para cada objetivo del microscopio), que longitud en μm representa cada división. Esta calibración se realiza con una regla de pequeñas dimensiones, en general de 1 o 2 mm de longitud, con divisiones de 10 μm . Esta regla está dispuesta en un portaobjetos (**portaobjetos graduado** o **micrómetro objetivo**) el cual se coloca en la platina y se enfoca con el ocular graduado.

Las medición de las divisiones del ocular (fig. 1 A), se lleva a cabo haciendo coincidir lo más exactamente posible el cero de ambas escalas y verificando a partir de dicho valor donde vuelven a coincidir (con la misma precisión que en el cero) dos líneas de dichas escalas. Seguidamente se divide el valor en μm de dicho punto (tomado de la escala del portaobjetos graduado) por el número de divisiones correspondientes de la escala del ocular, obteniéndose (para ese aumento) el **coeficiente micrométrico** (a cuanto equivale en μm una división del ocular).

En aumentos altos (v.g. 1000x), las líneas del portaobjetos graduado se ven magnificadas (fig. 1 B), por lo que no es sencillo hacer coincidir ambas escalas. En este caso se alinea el cero del objetivo con uno de los bordes de la línea cero del portaobjetos, y se busca en que valores de las escalas se da el mismo tipo de alineación.

Una vez determinados los coeficientes micrométricos, se completa la siguiente tabla, que será utilizada para realizar mediciones sobre especímenes:

O B J E T I V O

n° de divisiones del ocular graduado	100 X (μm)	400 X (μm)	1000 X (μm)
1			
2			
3			
4			
5			
...
100	680	170	68

Los valores que se muestran en la tabla son a modo de ejemplo. Como puede observarse comparando los guarismos en 100x y 1000x, se trata valores esperados (ya que los objetos se ven exactamente 10 veces más grandes a 1000x que a 100x). Esto no siempre sucede, debido a pequeñas diferencias entre las ópticas, razón por la cual los cálculos deben llevarse a cabo para todos los aumentos (en este caso, 100x, 400x y 1000x), y para cada microscopio en particular.

FICOLOGÍA

PROGRAMA TEÓRICO

1. Las algas como organismos modelo para el estudio de la evolución biológico

Diversidad algal. Taxonomía, sistemática y filogenia. Concepto de especie en algas: concepto biológico, morfológico y filogenético. La importancia de la identificación a nivel específico y los problemas relacionados. Construcción de árboles filogenéticos. La naturaleza compuesta de las algas. Cloroplastos con 2, 3 y 4 membranas. Teoría de la endosimbiosis: el aporte de las filogenias moleculares.

2. Diversidad de la reproducción

Ciclos de vida en las algas. Alternancia de generaciones y frecuencia de fases haploides y diploides en relación al éxito reproductivo. Mecanismos. Ecofisiología de los ciclos de vida. Longevidad. Genética poblacional y la estructura de las comunidades, con especial énfasis en las algas marinas bentónicas

3. Las algas como laboratorios para estudios fisiológicos y bioquímicos

La fotosíntesis en el medio acuático. Factores limitantes de la productividad y la biomasa poblacional. Optimización de la captación de la energía radiante y mecanismos concentradores de dióxido de carbono. Otras formas de nutrición. Mixotrofia y heterotrofia. Importancia en el reciclado de la materia orgánica en los ecosistemas acuáticos.

4. Las algas y su papel en el ciclo de los nutrientes entre la biósfera, la hidrósfera, la litósfera y la atmósfera

Cyanobacteria fijadoras de nitrógeno; su aplicación como biofertilizantes. Floraciones algales. Grupos involucrados, toxicidad, importancia económica y social; rol de los nutrientes y de la contaminación. Análisis de casos testigo. Las algas en el ciclo del carbono. Reservorios de carbono refractario en sedimentos. Importancia de las algas en relación al efecto invernadero. Las algas en el ciclo del azufre. Aerosoles naturales de compuestos volátiles de azufre o halogenados. Incidencia en el cambio climático global. Papel de las algas como bioindicadoras paleoambientales. Grupos involucrados. Nociones de bioestratigrafía. Métodos de estudio. Ejemplos.

5. Algas para biomonitoreos

Concepto de organismo bioindicador. Importancia y ventajas del uso de las algas en monitoreos a corto, mediano y largo plazo. Grupos involucrados. Determinación de stress ambiental agudo o prolongado. Contaminación crónica. Cultivos en laboratorio y experiencias a campo. Estandarización de los métodos según organismos internacionales de protección ambiental.

6. Cultivo de micro y macroalgas.

Productos naturales extraídos de las algas. Biocombustibles. Procesos productivos y aspectos sanitarios. Interacciones biológicas.

BIBLIOGRAFÍA:

Phycology. (4ª Edición). R. E. Lee. Cambridge University Press, 2008.

- Biology of the Red Algae. K. M. Cole & R. Seath. Cambridge University Press, 1995.
- Red Algae in the Genomic Age. J. Seckbach & D.J. Chapman (eds.), Springer Science+Business Media B.V, 2010.
- Unravelling the Algae. J. Brodie & J. Lewis (Eds). CRC Press Taylor & Francis Group, 2007
- Freshwater Algae. Identification and Use as Bioindicators. E.J. Bellinger & D.C. Sigee. Wiley-Blackwell, 2010.
- Algae. L. E. Graham et al., 2da. Edición, Benjamin Cummings, 2009.
- An Introduction to Phycology. Van den Hoek, D. G. Mann & H. M. Jhans. Cambridge University Press, 1995.
- Seaweed Ecology and Physiology. Ch. S. Lobban & P. J. Harrison. Cambridge University Press, 1997.

RÉGIMEN DEL CURSO

Trabajos Prácticos

El alumno deberá aprobar el 80% de las clases. Para ello se requiere que concurra al laboratorio con los conocimientos teóricos necesarios y cumplir con las actividades correspondientes al tema del día. Se evaluará de acuerdo al desempeño y a la corrección de los informes en caso que corresponda.

Evaluación:

La nota final de la materia estará basada en las calificaciones obtenidas en:

- informes de los TPs
- 2 parciales teóricos
- presentaciones grupales
- trabajo final grupal

Todas estas instancias se aprobarán con un mínimo del 50% del puntaje máximo.

Promoción: los alumnos estarán en condiciones de promocionar si el promedio de calificaciones supera los 7 puntos, en caso contrario deberá rendir un examen final

TRABAJO PRÁCTICO N°1

TECNICAS DE CULTIVO DE MICROALGAS

Introducción

Los cultivos de algas constituyen una herramienta importantísima y casi indispensable para diversos estudios (taxonómicos, morfológicos, citológicos, fisiológicos, genéticos, moleculares, etc). Mediante su uso, ha sido posible hacer una reevaluación de las delimitaciones taxonómicas en diferentes grupos, del polimorfismo, de la resistencia a antibióticos, de la citología, genética y mutaciones y se ha contribuido al entendimiento del ciclo de vida de muchas especies. El desarrollo de cultivos de microalgas, también ha permitido la realización de estudios que tienen una aplicación práctica, como por ejemplo los relacionados a la capacidad de fijación de nitrógeno (agricultura); a la inducción e inhibición de crecimiento de otros organismos; a la producción de compuestos de interés (vitaminas, pigmentos, ácidos grasos, etc.); a la sensibilidad y tolerancia a tóxicos (calidad de aguas, impacto ambiental).

Entonces, para los distintos tipos de estudios mencionados, es necesario desarrollar cultivos de microalgas a escala de laboratorio. Normalmente lo que se busca, es optimizar su crecimiento, para lo cual se realiza un estudio de los requerimientos de la especie utilizada. Para muchas especies, éstos ya han sido determinados y normalmente se parte de ese medio de cultivo y se modifica de acuerdo al tipo de estudio que uno desea realizar (obtener biomasa, evaluar efecto de deficiencia de nutrientes, inducir reproducción sexual, inducir síntesis de ciertos metabolitos, etc.). Además, el tipo de estudio que se desea realizar, condiciona el medio de cultivo a utilizar y el tipo de cultivo a desarrollar, ya que los estudios taxonómicos o citológicos requieren poco material algal, mientras que los estudios bioquímicos requieren cantidades mucho mayores.

Existen distintos tipos de medios de cultivo:

a- Medios minerales definidos (soluciones con concentraciones definidas de ciertos minerales indispensables para el crecimiento de las algas)

b- Medios minerales definidos con agregado de compuestos orgánicos (factores de crecimiento y/o vitaminas, compuestos orgánicos como fuente de carbono: glucosa o acetato)

c- Medios no definidos (no se puede establecer la cantidad y/o calidad de sus componentes, pero crecen muy bien ciertos grupos de algas, ej.: medio Tierra-agua)

A su vez, estos medios pueden ser líquidos o sólidos (solidificados con el agregado de 1,5 % - 2 % P/V de agar). Los medios de cultivo líquidos se disponen en frascos, tubos o erlenmeyers, los medios sólidos en cajas de Petri o en tubos "pico de flauta". Tanto los medios de cultivo como el material que se usará para su manipulación deben esterilizarse.

Métodos de aislamiento

Una vez obtenida la muestra de agua (recolectada con red de fitoplancton de 16 μm de poro o con botella) existen distintos métodos de aislamiento que pueden aplicarse de acuerdo a lo que se desea aislar:

- Estriado: se realizan una o más estrías con un ansa sobre medio agarizado contenido en una caja de Petri.
- Pulverizado: se coloca una suspensión de la muestra en un pulverizador o en un pastillero con capilar estériles, y se vaporiza mediante una corriente de aire (que pasa a través de un filtro estéril que asegura la eliminación de impurezas y microorganismos) sobre cajas de Petri conteniendo medio agarizado.
- Aislamiento con micropipeta: se recoge con una micropipeta estéril una o más células de la especie que se desea aislar y se transfiere sucesivamente por 3 o 4 gotas de agua destilada o medio de cultivo estéril para eliminar la mayor parte de los organismos contaminantes y luego se transfiere con micropipeta a un tubo conteniendo medio líquido ó sólido.

Una vez realizado el aislamiento, las cepas son mantenidas como cultivos "stock" (normalmente en tubos pico de flauta entre 20° y 25° C bajo luz continua ó fotoperíodo 12-12 L-O). Posteriormente, los cultivos pueden ser purificados hasta un estado axénico (libre de bacterias) por distintos métodos (irradiación UV, adición de antibióticos al medio de cultivo, limpieza de una suspensión del cultivo con detergente de alto peso molecular)

Objetivos

Aplicación de distintas técnicas de aislamiento y cultivo de microalgas. Familiarización con el manejo del material de laboratorio y las dificultades que se presentan en el manejo de dichas técnicas. Análisis y discusión de las ventajas y desventajas de los distintos métodos de cultivo, en relación a la finalidad que se persiga en los distintos tipos de investigaciones en los que estos deben aplicarse.

Materiales

- cajas de Petri estériles
- Tubos con diferentes medios de cultivo agarizados (BBM y BBM extracto de suelo)
- Vaporizadores estériles
- Ansas
- Mechero
- Muestras de cuerpos de agua

Procedimiento

A partir de una muestra de agua conteniendo diferentes microalgas, cada grupo de alumnos aplicará los distintos métodos de aislamiento:

- Llenar cada caja de Petri con cada uno de los medios de cultivo.
- Cuando éste solidifique, sembrar una caja realizando una estría con el anza cargada con muestra.
- La otra caja, sembrarla mediante pulverizado de una suspensión de la misma muestra.

Las cajas se incubarán por una semana a temperatura ambiente y luz continua. A los 7 días, cada grupo deberá analizar bajo lupa y microscopio las diferentes colonias algales. Determinarlas a nivel de género. Aislar los distintos géneros encontrados, sembrando en tubos pico de flauta desde las colonias identificadas en las cajas de Petri. Analizar las diferencias observadas en el tipo de crecimiento de los cultivos sembrados por estriado y pulverizado. Analizar las diferencias encontradas en cuanto a las especies desarrolladas en

los distintos medios de cultivo probados, discutir los factores que pueden haber incidido en esas diferencias (concepto de medio selectivo).

BIBLIOGRAFÍA

- ANDERSEN, R.A. 2005. Algal culturing techniques. Academic Press. 578 pp.
- BREZINA, V. 1979. The technique of microcultivation of algae. In: Algal Assays and Monitoring Eutrophication (Marvan, P., Pribil, S. & Lhotský, O., Eds.). Schweizerbart'sche Verlagsbuchhandlung. Stuttgart. 153-161.
- GONZALEZ, M., PARRA, O. & CIFUENTES, A. S. 1995. Técnicas de cultivo de microalgas en laboratorio. En: Manual de Métodos Ficológicos (Alveal, K., Ferrario, M., Oliveira, E. & Sae, E., Eds.). Universidad de Concepción. Chile. 219-250.
- STEIN, J. R. 1973. Handbook of Phycological Methods. Culture Methods and Growth Measurements. University Press. Cambridge. 449 pp.

APÉNDICE I

MEDIOS DE CULTIVO PARA MANTENIMIENTO Y CRECIMIENTO DE MICROALGAS

Bold's Basal Medium (BBM): este medio es útil para el mantenimiento y crecimiento de microalgas, principalmente del grupo de las Chlorococcales (Chlorophyta).

Preparar previamente las siguientes soluciones stock de macro y micronutrientes:

- | | | |
|---|-------|-----------------------------|
| 1) NaNO ₃ | | 10g/400 ml agua bidestilada |
| 2) KH ₂ PO ₄ | | 7g/400 ml agua bidestilada |
| 3) K ₂ HPO ₄ | | 3g/400 ml agua bidestilada |
| 4) MgSO ₄ .7H ₂ O | | 1g/400 ml agua bidestilada |
| 5) CaCl ₂ .2H ₂ O | | 1g/400 ml agua bidestilada |
| 6) NaCl | | 1g/400 ml agua bidestilada |

I) Solución stock EDTA: diluir 50 g de EDTA (Ethylenediaminetetracetic acid) y 31 g de KOH, llevando a un volumen final de 1 l en agua bidestilada.

II) Solución stock de Fe: diluir 4,98 g de FeSO₄ .7H₂O llevando a un volumen final de 1 l en agua bidestilada acidificada. (Esta última se prepara agregando 1 ml de H₂SO₄ concentrado a 999 ml de agua bidestilada).

III) Solución stock de Boro: diluir 11,42 g de H₃BO₃ a 1 l con agua bidestilada.

IV) Solución stock de Micronutrientes: diluir 8,82 g de ZnSO₄ .7H₂O; 1,44 g de MnCl₂ .4H₂O; 0,71 g MoO₃; 1,57 g CuSO₄ .5H₂O y 0,49 g Co(NO₃)₂ . 6H₂O a 1 l con agua bidestilada acidificada (preparada como se describió arriba).

El medio de cultivo se prepara agregando 10 ml de las soluciones 1 a 6 y 1 ml de las soluciones I a IV a 936 ml de agua bidestilada. Verificar que el pH del medio sea 5,5 (si no es así, ajustar el pH con solución de KOH)

Este medio se utiliza para cultivos líquidos (en cuyo caso es preferible mantenerlos con agitación) y para cultivos sólidos se lo solidifica agregando 1,5 % (P/V) de agar-agar.

BBM extracto de suelo: se prepara con diferentes proporciones de BBM y extracto de suelo (1:1, 2:1, 3:1 V:V). Este medio también se utiliza en forma líquida o sólida.

Extracto de suelo: sobrenadante de medio bifásico tierra agua.

TRABAJO PRÁCTICO N°2

ESTIMACIÓN DE LA TASA DE CRECIMIENTO EN CULTIVOS DE MICROALGAS POR RECUENTO CELULAR

Introducción

El recuento celular es una herramienta muy utilizada para el estudio del fitoplancton, tanto en cultivo como a campo. Si se grafica el número de células por mililitro en función del tiempo se obtiene la curva de crecimiento de la población de algas. A partir de esta curva se puede conocer la edad o estado de la población en cuestión. La comparación de parámetros tales como la tasa de crecimiento, tasa de mortalidad, la capacidad de carga de la población, etc. permite la comparación de distintos procesos fisiológicos sobre la base de la densidad celular (Guillard, 1973; Wood et al., 2005).

Uno de los métodos frecuentemente utilizados para el recuento celular en cultivos axénicos consiste en la utilización de la cámara de Neubauer (Figura 1). Como lo muestra la Figura 2, la cámara de Neubauer consta de una grilla formada por 9 cuadrados, cada uno de 1 mm de lado (área total 9 mm²). Estos cuadrados a su vez están subdivididos en 16 cuadrados de 0.25 mm de lado o en la subdivisión más pequeña (área central) en cuadrados de 0.0025 mm². La cámara tiene 0.1 mm de profundidad y por lo tanto, cada grilla completa podrá contener 0.009 ml³ de suspensión de algas (Schoen, 1988).

Figura 1: Cámara de Neubauer

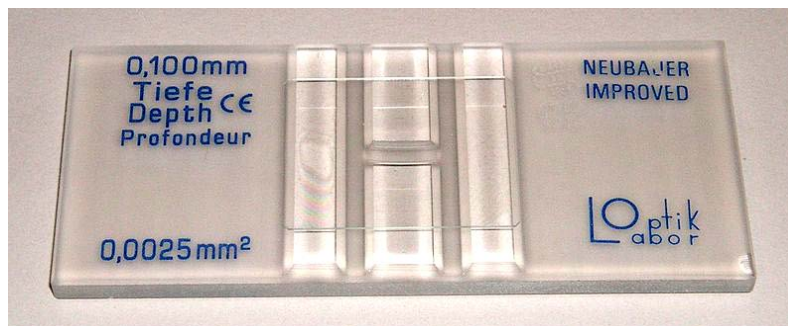
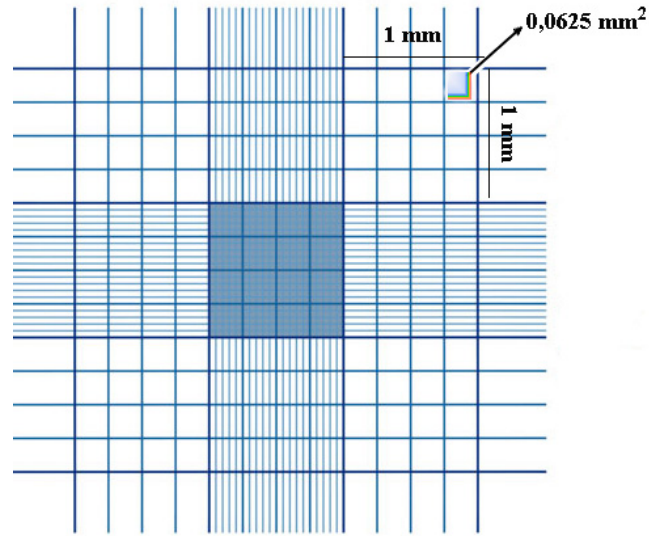


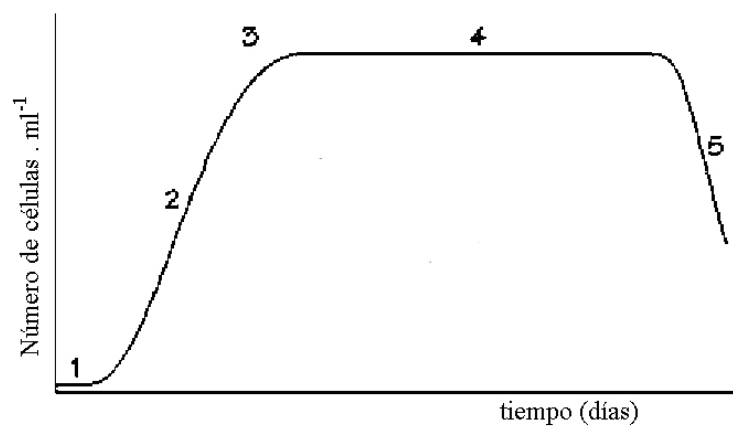
Figura 2: La grilla para recuento celular en la cámara de Neubauer



La curva de crecimiento de un cultivo axénico de microalgas se caracteriza por las siguientes cinco fases (Fig 3):

1. **Fase lag o de inducción.** Esta fase está relacionada con la adaptación fisiológica del metabolismo celular a las condiciones de cultivo, por ejemplo el incremento de los niveles de enzimas y metabolitos implicados en la fijación de carbono o la división celular. La duración de esta fase es variable, dependiendo del estado previo del inóculo y del medio al que se lo expone.

Figura 3. Las cinco fases del crecimiento de microalgas en cultivo.



1. **Fase exponencial.** Durante esta fase, la densidad celular (N) aumenta en función del tiempo (t) según la función logarítmica:

$$N_t = N_0 \cdot e^{rt} \quad (\text{Ec. 1})$$

Donde N_t y N_0 corresponden al número de células por unidad de volumen a los tiempos t y 0 , respectivamente y r = la tasa de crecimiento específica o parámetro Malthusiano. La tasa de crecimiento específica dependerá de la especie y de factores ambientales tales como la intensidad lumínica, temperatura, nutrientes, presencia de xenobióticos, etc.

2. **Fase de declinación.** La frecuencia de división celular se retarda a medida que factores tales como los nutrientes, la luz, el pH, la concentración de dióxido de carbono, etc comienzan a ser limitantes del crecimiento.
3. **Fase estacionaria.** En esta fase el factor limitante del aumento del número de células y la tasa de crecimiento específica están balanceados, resultando en un valor relativamente constante de la densidad celular
4. **Fase de declinación.** Las condiciones del medio son tales que no pueden sostener el crecimiento de la población, por ejemplo por agotamiento de nutrientes, deficiencia de oxígeno, sobrecalentamiento, cambios importantes en el pH, contaminación, etc.). La densidad celular decrece rápidamente y, eventualmente, el cultivo muere.

Volviendo a la Ecuación 1, podemos resolverla matemáticamente aplicando el logaritmo natural:

$$r = \ln (N_t / N_0) / \Delta t \quad \text{ó}$$

$$r = (\ln N_t - \ln N_0) / \Delta t \quad (\text{Ec. 2})$$

Si estamos en la fase exponencial, asumimos que la tasa de mortalidad es nula y por lo tanto r (unidades tiempo⁻¹) representará a la tasa de crecimiento específica. Por otro lado, a partir de r , podemos obtener otro parámetro interesante, el tiempo de duplicación (T_d) de la población dividiendo el logaritmo de 2 (0. 6931) por el valor de r , obteniendo:

$$\text{Tiempo de duplicación } (T_d) = 0.6931/r$$

Si r , por ejemplo está expresado en días^{-1} , el valor de T_d nos dirá cuántos días deben transcurrir para que la población duplique el número de células.

Objetivos

1. Obtener la curva de crecimiento de un cultivo axénico de una microalga por recuento celular en cámara de Neubauer.
2. Calcular la tasa de crecimiento exponencial y el tiempo de duplicación en las condiciones de cultivo empleadas.

Materiales y Métodos

1. Se le proveerá un cultivo inóculo. A partir del mismo, cada grupo asignado de alumnos, iniciará un cultivo, tomando dos muestras iniciales del mismo (N_0) en sendos tubos Eppendorf. Las muestras se fijarán con formol diluido.
2. Cada 24 horas, se repetirá el procedimiento de 1.
3. Al realizar el recuento conviene utilizar un contador de ganado o una calculadora para evitar levantar la vista del microscopio. Cargue la cámara de Neubauer según las indicaciones del docente, cuidando que la muestra que introduzca haya sido previamente bien homogeneizada. De acuerdo a la densidad de la muestra a contar, Usted seleccionará qué subdivisiones de la cámara de Neubauer le resultan más sencillas de contar. En general si el número de células por unidad de área es superior a 30 – 40, el recuento se hace muy complicado.
4. Efectúe al menos 10 recuentos por unidad de área seleccionada y calcule la media y desviación estándar para los valores obtenidos, volcando los valores en la tabla siguiente:

Muestra	Vol. Área contada	Media del Número de células/área contada	Desviación estándar	Número de células . ml ⁻¹
Día 0				
Día 1				
Día 2, etc.				

Recuerde para el cálculo de los volúmenes de cada área de la cámara el esquema de la Figura 1.

Por ejemplo, supongamos que Usted contó una media de 20 células en un área de 1 mm² de la cámara de Neubauer. Pero como la cámara tiene una superficie total de 9 mm², el número total promedio de células por cámara completa será de 20 x 9 = 180 células. Como la cámara tiene un volumen total de 0.009 ml, en la muestra el número total de células por ml será de 180 células x (1 ml / 0.009 ml) = 2.0 x 10⁴ células. ml⁻¹.

Es frecuente en los recuentos utilizar un error estándar menor del 10%, calculado según la fórmula siguiente:

$$E = \frac{S / \sqrt{N}}{X} \cdot t_{(n-1)} \quad \text{donde,}$$

X: media del número de células contadas en los campos X1, X2, etc.

S: desviación estándar

N: número de campos (subdivisiones de la cámara) contados (raíz cuadrada)

t_(n-1) valor de la función t de la Tabla de apéndice

Para obtener un error igual o menor al 10% el valor de esta ecuación x 100 deberá ser menor o igual a 10.

5. Grafique el número de células. ml⁻¹ en función de los días. Estime la constante de crecimiento y el tiempo de duplicación de su cultivo.

Bibliografía

Guillard, R.R.L. 1973. Division rates. En: Handbook of Phycological Methods (Stein, J.R. (ed.)). Cambridge Univ. Press, pp 289-312.

Shoen, S. 1988. Cell Counting. En: Experimental Phycology. A Laboratory Manual (Lobban, C.S.; Chapman, D.J. y Kremer, B.P., eds). Cambridge University Press: 16-22.

Wood, M.A., R.C. Everroad & L.M. Wingard. 2005. Measuring Growth Rates in Microalgal Cultures. En: Algal Culturing Techniques (Andersen, R.A., ed). Elsevier, Academia Press, pp269-286.

Ejercitación adicional

1. Los datos de la Tabla siguiente fueron obtenidos en un cultivo axénico de *Chlamydomonas reinhardtii* bajo condiciones mixotróficas. El tratamiento consistió en el enriquecimiento del medio con una dosis subletal de cobre.

Tiempo (horas)	Control	Tratamiento
	Células. ml ⁻¹	
0	5082	5083
24	28519	13381
48	845000	106281
72	4580000	615000
96	8220000	2850000
120	9380000	6660000
168	9510000	9850000
196	9490000	9820000

- Represente las curvas de crecimiento en función del tiempo para estos cultivos
- Calcule la tasa de crecimiento exponencial para cada uno de ellos.
- ¿Qué puede decir sobre el efecto del metal sobre el crecimiento en esta experiencia?

2. En una serie de experiencias clásicas con las diatomeas *Asterionella formosa* y *Cyclotella meneghiniana*, Tilman (1976) estudia el efecto de la limitación de fósforo y sílice en el medio de cultivo, obteniendo los datos de la tabla siguiente:

	Limitación de S		Limitación de P	
	μ_{\max} (días ⁻¹)	K_s ($\mu\text{M SiO}_2$)	μ_{\max} (días ⁻¹)	K_s ($\mu\text{M PO}_4$)
<i>A. formosa</i>	1.59	3.9	0.76	0.04
<i>C. meneghiniana</i>	1.74	1.4	0.76	0.25

- Utilizando la ecuación de Monod ($\mu = \mu_{\max} S / (K_s + S)$) indique cuál de las dos especies dominará ante una situación de limitación de sílice y cuál lo hará ante la limitación de fósforo. ¿Qué término de la ecuación se lo indica?
- Represente ahora en dos gráficos diferentes (uno para Si y otro para P) el crecimiento de estas dos especies según la ecuación de Monod. Considere un rango de nutrientes entre 0 y 10 μM . Discuta estos gráficos dentro de un contexto de ambiente natural.

3. Los siguientes valores corresponden a una experiencia con un alga filamentosa que se cultivó a salinidades crecientes (3, 7.5, 15, 30‰) en pocillos de idéntico volumen. El

crecimiento se estimó midiendo el área cubierta por los filamentos en el fondo del pocillo (mm^2). Se proveen las medias de los datos correspondientes a 4 réplicas.

Día	Salinidad			
	3	7.5	15	30
0	24	17	25	23
15	25	19	28	25
7	28	23	47	35
12	57	44	120	147
14	58	44	267	229
19	76	93	333	394
26	83	123	411	644

- a) Grafique las curvas de crecimiento para las diferentes salinidades.
- b) Comparando las constantes de crecimiento específicas, ¿qué podría concluir sobre el efecto de la salinidad en esta especie?

TRABAJO PRÁCTICO N°3

LA VACUOLA CONTRÁCTIL COMO ORGANELA OSMOREGULATORIA

Introducción

La diferencia de potencial hídrico entre el medio externo y el interior de la célula determina un flujo espontáneo de agua hacia dentro de la célula. **Explique**

Las células con paredes rígidas (plantas superiores, algunas algas) desarrollan un potencial de turgencia. Esta presión hidrostática interna permite llegar al equilibrio de los potenciales hídricos externo e interno, aún cuando el potencial osmótico celular sea menor (más negativo) que el del medio. El equilibrar los potenciales hídricos interno y externo, el intercambio neto de agua con el entorno será nulo. Por otro lado, el potencial de turgencia será de mayor magnitud cuanto más hipotónico sea el entorno.

En organismos sin paredes o con paredes discontinuas (por ejemplo algas flageladas) viviendo en cuerpos de agua dulce el control del potencial osmótico celular opera mediante vacuolas contráctiles.

¿En qué grupos esperaría encontrar vacuolas contráctiles?

Mediante una ecuación sencilla indique porqué en estos organismos el potencial hídrico de la célula depende de la regulación del potencial osmótico.

Según esta ecuación, ¿esperaría que estos organismos flagelados tuviesen vacuolas contráctiles en medio marino?

Las vacuolas contráctiles descargan su contenido por un punto fijo de la superficie celular. Estas vacuolas operan siguiendo un ciclo que consta de dos fases: el llenado de la vacuola (**diástole**) seguido de la contracción de la misma durante la expulsión (**sístole**). Durante la diástole varias vesículas pequeñas se fusionan a una vacuola central grande, que aumenta su tamaño y se redondea. Esta fusión ocurre simultáneamente con el “bombeo de agua” dentro de la vacuola. Para movilizar este bombeo de agua hay transporte activo de iones (o de solutos). Esta acumulación de iones provoca la entrada espontánea de agua a la vesícula según un gradiente de potencial hídrico decreciente. Una vez que la gran vacuola central está llena, es “estrujada” por filamentos de proteínas contráctiles, que se encuentran

asociados al tonoplasto. En ese momento, la vacuola se fusiona con la membrana plasmática y desaparece del campo visual del microscopio. El momento de la desaparición de la vacuola contráctil se puede tomar como el punto inicial para medir el tiempo entre dos sístoles. Este tiempo es variable y depende del estado nutricional, la temperatura y la especie, oscilando entre 10-30 s y 50-90 s. Sin embargo, medido en condiciones constantes, esta frecuencia de pulso suele no variar.

Objetivo

Estimar el potencial osmótico celular utilizando la disminución de la frecuencia de pulso de la vacuola contráctil en *Asterococcus limneticus*.

Para ello, las células se someten a salinidades crecientes (o soluciones de concentración creciente de cloruro de sodio), midiendo la disminución de la frecuencia de pulso de la vacuola contráctil entre dos ciclos sucesivos. Cuando se igualen los potenciales hídricos interno y externo, la vacuola contráctil dejará de funcionar. **Explique.**

Materiales y Métodos

Cultivo de *Asterococcus limneticus*

Solución de NaCl 200 mM. (Puede utilizarse en reemplazo una solución de sacarosa 350 mM)

Micropipetas

Tubos de ensayo (o similar)

Resuspender hasta obtener una suspensión homogénea el cultivo del alga. Trasvasar los volúmenes indicados en la Tabla siguiente de suspensión de algas y de solución de NaCl (o sacarosa) a 8 tubos de ensayo rotulados convenientemente. Agitar suavemente y dejar equilibrar unos 15 minutos.

Luego tomar de cada uno de los tubos una alícuota y medir al microscopio el tiempo entre sístoles. Tomar al menos 3 mediciones y calcular el de la frecuencia de pulsación (\pm DS). Es importante que el preparado no se seque durante sus mediciones.

Tubo	Suspensión algal (μ l)	Solución NaCl (μ l)
0 (Control)	2000	0
1	1900	100
2	1800	200
3	1700	300
4	1600	400
5	1400	600
6	1000	1000
7	600	1200

Cálculos

Para estimar el potencial osmótico de la solución a la que la vacuola contráctil deja de funcionar suponga que en agua destilada el potencial osmótico es de 0 MPa. Este valor se es lineal hasta -0.92 MPa, que es el potencial osmótico correspondiente a las soluciones stock de NaCl (o de sacarosa utilizadas). Calcule para cada una de las diluciones el potencial osmótico correspondiente.

Bibliografía

Kirst, G.O. 1988. The contractile vacuole as an osmoregulatory organelle. En: Experimental Phycology. A Laboratory Manual (Lobban, C.S., Chapman, D.J. y Kremer, B.P., eds). Cambridge University Press: 224-227.

TRABAJO PRÁCTICO N° 4

ADAPTACIÓN CROMÁTICA

Introducción

Los fotosistemas, en especial sus antenas, responden a cambios ambientales relacionados con la radiación incidente. Tres características de la luz son las que provocan cambios cuali y cuantitativos en los pigmentos fotosintéticos: intensidad, calidad espectral y dirección.

El objetivo del presente trabajo práctico es evaluar los efectos de la calidad espectral de la luz incidente sobre las ficobiliproteínas (en cantidad y proporciones relativas) en un cultivo de algas cuya identidad será determinada por el alumno mediante la utilización de claves dicotómicas.

Protocolo experimental

Tome una muestra del alga y obsérvela al microscopio para determinar su identidad mediante las claves dicotómicas. Confeccione los dibujos correspondientes.

Coloque una caja de petri conteniendo un repique de un cultivo del alga en cuestión bajo cada una de los filtros provistos (uno verde, uno rojo y uno blanco). Ubíquelos bajo una fuente de luz continua, donde quedarán por lo menos durante una semana.

Al cabo de ese tiempo, retire los cultivos y registre si hubo algún cambio macroscópico. Luego, tome una pequeña muestra de todos los cultivos y obsérvelos al microscopio, observando la morfología en cada caso a fin de compararla con la de los cultivos iniciales.

Estimación de la concentración de ficobilipigmentos

Coseche las algas restantes en sendos tubos Eppendorf previamente tarados. Centrifugue, elimine el sobrenadante y tome el peso fresco de la masa de algas (restando la tara del tubo).

Resuspenda el material de cada tubo en 0,5 mL de buffer fosfato 0,1 M, pH 6,8. Mantenga sobre hielo y proteja de la luz ambiente envolviendo los tubos con papel de aluminio. Sonique el contenido de los tubos, centrifugue y recoja el sobrenadante, conservando el residuo celular sobre hielo.

Repita este procedimiento con nuevo agregado de buffer. Reúna los sobrenadantes (volumen final: 1 mL) y tome los valores de absorbancia a 565, 620 y 650 nm.

La concentración de los diferentes ficobilipigmentos (mg/mL) se estima mediante las siguientes ecuaciones (Chapman, 1988):

$$\text{C-ficocianina: } \frac{A_{620} - 0,72 \times A_{650}}{6,29}$$

$$\text{C-ficoeritrina: } \frac{A_{565} - 2,41(\text{conc.CPC}) - 1,40(\text{Conc.APC})}{13,02}$$

$$\text{aloficocianina: } \frac{A_{650} - 0,191 \times A_{620}}{5,79}$$

Los ficobilipigmentos se expresan como mg pigmento . mg de peso fresco⁻¹.

Estimación de la concentración de clorofila

Resuspenda el residuo celular de la extracción de ficobilipigmentos en 1 mL de acetona. Agite vigorosamente en un vórtex. Centrifugue y conserve el sobrenadante protegido de la luz. Si observa que el residuo todavía retiene color verde, repita la extracción con el solvente orgánico.

Tome la absorbancia a 665 nm y calcule la concentración de clorofila a (mg. mL⁻¹) según la siguiente fórmula:

$$\text{Chl a} = \frac{\text{Abs (665 nm)}}{74.5}$$

74.5

Expresar el valor como mg pigmento . mg de peso fresco⁻¹.

Resultados

El informe debe incluir los dibujos de las observaciones microscópicas al inicio y final de la experiencia, junto con la identificación taxonómica del material.

Complete la siguiente tabla con los datos obtenidos:

	Luz blanca	Luz verde	Luz roja
Ficoeritrina (mg.mg p.f. ⁻¹)			
Ficocianina (mg.mg p.f. ⁻¹)			
Aloficocianina (mg.mg p.f. ⁻¹)			
Clorofila <i>a</i> (mg.mg p.f. ⁻¹)			
Ficobilipigmentos / clorofila <i>a</i>			

Discusión

Para la discusión tenga en cuenta las siguientes preguntas:

¿Qué es un ficobilisoma? ¿En qué divisiones y/o clases de algas los puede encontrar?

¿Cuáles son los efectos de la luz roja y de la luz verde sobre el contenido de los ficobilipigmentos?

¿Y sobre la clorofila *a*?

¿Observó algún tipo de adaptación cromática? Explique el fundamento teórico según la bibliografía provista.

Bibliografía

Chapman, D.J. 1988. Chromatic adaptation in Cyanobacteria. En: Experimental Phycology. A Laboratory Manual (Lobban, C.S., Chapman, D.J. y Kremer, B.P., eds). Cambridge University Press: 134-140.

TRABAJO PRÁCTICO N°5

MOVILIDAD EN ALGAS (TROPISMOS)

1. EFECTO DE LA LONGITUD DE ONDA DE LA LUZ SOBRE LA RESPUESTA FOTOTÁCTICA EN *EUGLENA SP.*

Introducción

Para organismos fotosintéticos como las algas, la luz es una fuente de información primordial sobre las condiciones del entorno. La percepción de la información lumínica, su interpretación e integración puede transformarse en respuestas de crecimiento, movimiento, reproductivas, etc. Por ejemplo, las algas pueden regular su exposición a la luz ya sea nadando en dirección a la misma para superar la limitación lumínica y favorecer a la fotosíntesis (fototropismo positivo) o alejándose de la misma y evitar la foto-oxidación de pigmentos (fototropismo negativo). En cualquier caso, deben “ver” y “procesar” la señal lumínica para poder satisfacer un dado requerimiento. La visión en las algas cuenta con dos elementos esenciales: a) la antena (el estigma) y b) el detector (el fotorreceptor, una proteína de la familia de las rodopsinas).

Objetivo

Evaluar la longitud de onda (verde, rojo, azul) que provoca la respuesta fototáctica más intensa en *Euglena gracilis*.

Materiales

Cajas de petri.

Material opaco: cartón, papel de aluminio.

Hoja de papel blanco para usar de contraste claro.

Fuente de luz blanca.

Papeles de celofán rojo, verde, azul.

Cultivo de *Euglena sp.* (aprox. 15 mL/caja)

Gillette.

Cinta adhesiva.

Reloj o cronómetro.

Procedimiento

1. Cubra los lados y la tapa de la caja de petri con el papel opaco. Deje el fondo al descubierto, apoyado sobre la hoja de papel, para fabricar un campo claro de contraste.
2. Corte cuatro aberturas del tamaño de una moneda de 10 centavos, separadas uniformemente, cerca del borde de la tapa de la caja de petri.
3. En una de las tapas, el “control”, deje las cuatro aberturas descubiertas para permitir que pase la luz blanca de la lámpara. En la otra, cubra las aberturas con celofán coloreado, de sólo uno de los tres colores provistos, y fíjelo con cinta adhesiva.
4. De ser necesario, resuspenda el cultivo en el tubo de ensayo con cuidado, agitando suavemente.
5. Vierta 10-20ml de cultivo en las cajas de petri y cubra con las tapas correspondientes.
6. Ubique las cajas bajo la fuente de luz blanca. Inicie su cronómetro. Debería obtener resultados en aproximadamente 10 minutos.
7. Transcurrido el tiempo convenido, apague la fuente de luz y observe.
8. Registre cuidadosamente sus observaciones, tanto de la caja “control” como de la “experimental”.

Resultados

1. Realice un esquema del arreglo experimental donde se vean las condiciones antes y después de la experiencia.
2. Ordene los colores en orden decreciente según la intensidad de la respuesta fototáctica observada.

Preguntas

1. ¿Cuál es el propósito de la caja “control”?
2. Proponga una hipótesis sobre qué longitud de onda desencadenará la respuesta fototáctica más intensa. Justifique.
3. ¿La respuesta fototáctica observada coincidió con sus predicciones? Explique.

2. RESPUESTA FOTOTÁCTICA EN EL EPIPELON MÓVIL

Materiales

Muestras de sedimento superficial de algún cuerpo de agua, tomada el día anterior, conservadas en oscuridad.

Cajas de petri (una por grupo)

Cubreobjetos y portaobjetos limpios y desengrasados

Pinzas de punta fina

Fuentes de luz blanca (una por grupo)

Procedimiento

- Eliminar la mayor cantidad de líquido posible de la muestra a utilizar
- Colocar una porción de muestra en cada caja de petri, homogeneizar con una varilla de vidrio y colocar sobre la superficie 2-4 cubreobjetos, sin tocar la superficie con los dedos.
- Ubicar cada caja bajo una fuente de luz por espacio de 1 hora
- Dejar una caja en oscuridad por el mismo periodo
- Retirar cuidadosamente los cubreobjetos y colocar cada uno de ellos sobre un portaobjetos con una gota de agua
- Observar

Resultados

Identifique a nivel genérico las algas que encontró en los preparados provenientes de la caja expuesta a la luz y la mantenida en oscuridad.

Explique los resultados obtenidos.

TRABAJO PRÁCTICO N°6

CUBIERTAS CELULARES

A. DETECCIÓN DE LA PRESENCIA DE ALGENANO EN LAS PAREDES ALGALES

Introducción

Una característica distintiva de las paredes de muchas microalgas o de las de ciertas estructuras de resistencia y/o reproducción es su extraordinaria resistencia a la ruptura mecánica y a la degradación química. Dicha resistencia está relacionada con la presencia de **algenano**, definido por Tegelaar como “las estructuras macromoleculares no hidrolizables presentes en las paredes celulares de un gran número de microalgas” (Tegelaar et al. 1989). Este biopolímero, componente habitual de los sedimentos orgánicos de los ambientes acuáticos, es resistente a la acetólisis y altamente refractario a la descomposición bacteriana (Zelibor et al. 1988). Como consecuencia de no ser biodegradable, se preserva selectivamente y enriquece la fracción del kerógeno (material sedimentario insoluble en solventes orgánicos habituales) en los procesos de fosilización.

La deposición de algenano en las paredes celulares ocurre en la vaina trilaminar, un estrato de la pared celular que recibe este nombre ya que al ser observado al microscopio electrónico de transmisión presenta una banda translúcida rodeada de dos bandas electrónicamente densas (Atkinson et al. 1972).

El estudio de la composición del algenano está enormemente dificultado por su nula solubilidad en solventes orgánicos. En líneas generales, puede decirse que consiste de cadenas polimetilénicas largas con distintos grados de sustitución y asociado a los polisacáridos fibrilares (celulosa) de la pared (Rodríguez et al., 1999).

El objetivo del siguiente trabajo práctico es identificar la posible presencia de algenano en la pared celular de dos microalgas mediante el tratamiento de acetólisis.

Procedimiento experimental

1. Separar por centrifugación las células de dos cultivos de microalgas diferentes provistas por los docentes. Reservar una porción para su identificación taxonómica.
2. Trasvasar las células a sendos viales con tapa hermética
3. Con cuidado y operando bajo campana agregar a cada vial con una pipeta Pasteur 18 gotas de anhídrido acético y dos gotas de ácido sulfúrico concentrado, tapando inmediatamente los viales.
4. Llevar a estufa a 100°C durante 90 minutos.
5. Retirar de la estufa y esperar que los viales lleguen a temperatura ambiente. Abrirlos y trasvasar su contenido a tubos de centrífuga.
6. Lavar repetidamente con a) solución saturada de bicarbonato b) agua c) etanol
7. Observar al microscopio.
8. Informe el resultado del tratamiento en las dos cepas de microalgas, indicando qué información obtiene del mismo.

Bibliografía

- Atkinson, A. W., Gunning, B. E. & John, P. D. 1972. Sporopollenin in the cell wall of *Chlorella* and other algae: ultrastructure, chemistry and incorporation of ^{14}C -acetate, studied in synchronous cultures. *Planta* 107:1–32.
- Rodríguez, M.C., Nosedá, M.D. & Cerezo, A.S. 1999. The fibrillar polysaccharides and their linkage to algaenan in the trilaminar layer of the cell wall of *Coelastrum sphaericum* (Chlorophyceae). *J. Phycol.* 35 :1025-31.
- Tegelaar, E. W., De Leeuw, J. W., Derenne, S. & Largeau, C. 1989. A reappraisal of kerogen formation. *Geochim. Cosmochim. Acta* 53:3103–6.
- Zeliber, J. L., Romankiw, L., Hatcher, P. G. & Colwell, R. R. 1988. Comparative analysis of the chemical composition of mixed and pure cultures of green algae and their decomposed residues by ^{13}C nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Appl. Environ. Microbiol.* 54:1051–60.

B.- EXTRACCIÓN DE CARRAGENANO

Introducción

Las paredes celulares de las Rhodophyta (como todas las paredes celulares) están construidas mediante dos matrices principales: la fibrilar y la amorfa.

Los polisacáridos fibrilares más frecuentemente encontrados en algas rojas son: la celulosa, el manano fibrilar y los xilanos. Todos estos polisacáridos se caracterizan por poseer una estructura secundaria con una marcada periodicidad de los monómeros componentes y del tipo y configuración del enlace glicosídico entre los mismos. Ello resulta en una estructura tridimensional de hélices que pueden agregarse en estructuras terciarias estabilizadas mediante puentes de hidrógeno. Como consecuencia los componentes fibrilares suelen ser casi cristalinos.

En contraposición a los polisacáridos de la matriz fibrilar, los que constituyen la matriz amorfa poseen una estructura secundaria caracterizada por regiones de marcada periodicidad interrumpidas por secuencias no periódicas que devienen de la presencia de un tipo de enlace diferente y/o una conformación distinta de anillo y/o la existencia de un sustituyente diferente y/o una ramificación de la cadena principal.

Este tipo de polisacáridos se caracterizan por ser altamente hidrofílicos. Dado su alto peso molecular, dan soluciones viscosas y en ocasiones, dependiendo de su estructura y del entorno fisicoquímico pueden formar geles.

Los polisacáridos de la matriz amorfa más frecuentes de algas rojas son galactanos sulfatados pertenecientes a la familia de los carragenanos y de los agaranos. Dadas sus propiedades viscosantes y/o gelificantes tienen variadas aplicaciones industriales.

Pequeña investigación preliminar de supermercado

Tome nota de los polisacáridos que figuran como ingredientes en los envases de los siguientes productos:

- . dulce de batata en lata
- . leche chocolatada
- . yogures semisólidos
- . postres lácteos (tipo Serenito)
- . helados
- . jalea de membrillo
- . pasta dental

Objetivo:

- . Aislamiento de carragenano de talos de *Gigartina skottsbergii*
- . Reconocimiento histoquímico de diferentes polisacáridos en el talo del alga.

Procedimiento

a) Aislamiento de carragenano

- . Resuspender 1 g de alga molida en 50 ml de agua destilada y dejar agitando durante 3 horas.
- . Al cabo de ese tiempo, separar el residuo celular por centrifugación. Observe las características del sobrenadante.
- . Volcar el sobrenadante sobre 200 ml de alcohol isopropílico, agitando con una varilla de vidrio.
- . Recoger el material que se adhiere a la varilla sobre un vidrio de reloj y secarlo suavemente con papel de filtro.
- . Liofilizar el carragenano.
- . Tomar el peso del carragenano liofilizado y hacer un cálculo del rendimiento en función de la masa de alga seca extraída.

b) Caracterización histoquímica:

- . Realizar cortes a mano alzada del material provisto.

Colorear con:

- . Lugol para la observación de polisacárido de reserva.
- . Azul de toluidina a pH 5 y a pH 1 para la observación de galactanos sulfatados
- . Calcofluor White para la observación de polisacáridos fibrilares

Incluir en el informe la especificidad de cada una de las coloraciones utilizadas

TRABAJO PRÁCTICO 7

EFFECTO DEL MEDIO DE CULTIVO DEFICIENTE EN FÓSFORO SOBRE LA ACTIVIDAD FOSFATASA ALACALINA EXTRACELULAR EN UNA DIATOMEA BENTÓNICA

Introducción

Una característica sobresaliente de los organismos agrupados dentro del grupo funcional “algas” es su diversidad filogenética, ultraestructural y fisiológica. Un ejemplo de esta diversidad lo constituyen los tipos de nutrición. Estos abarcan desde la fotoautotrofia, asimilación de nutrientes inorgánicos usando la luz como fuente de energía a través de la fotosíntesis oxigénica- y la heterotrofia, es decir la asimilación de nutrientes orgánicos que serán utilizados como fuente de biomasa y energía en las especies incapaces de fotosintetizar. Para completar este panorama, muchas especies pueden depender alternativamente de la fotosíntesis o de la asimilación de carbono orgánico, de acuerdo con las condiciones ambientales (mixotrofia). Los organismos mixotróficos pueden incorporar moléculas orgánicas de bajo o elevado peso molecular a través de la osmotrofia o la fagotrofia, respectivamente. Sin duda esta flexibilidad metabólica confiere a las algas la capacidad de sobrevivir en condiciones ambientales de intensidad lumínica y/o concentración de nutrientes cambiantes (Glibert y Legrand 2006).

En los ecosistemas acuáticos, los compuestos organofosforados pueden ser una fuente alternativa de P, sobre todo cuando su concentración supera a la del P inorgánico disuelto (Whitton y otros 2005). Los microorganismos acuáticos acceden a la fuente orgánica de P gracias a la acción de enzimas como las fosfatasas, que hidrolizan el P de los fosfoésteres y lo tornan disponible para transportadores de membrana (Duhamel y otros 2011). Las fosfatasas alcalinas de la familia PhoX son extracelulares y se localizan sobre la superficie externa de la membrana plasmática o en el entorno de las paredes celulares. Para evaluar el nivel trófico de distintos cuerpos de agua, se puede medir la actividad fosfatasa alcalina extracelular en muestras de fitoplancton, utilizando como sustrato compuestos organofosforados fluorescentes, (Whitton et al 2005).

Objetivo:

Cuantificar la actividad fosfatasa alcalina extracelular en diatomeas bentónicas pre-incubadas en presencia y ausencia de fósforo en el medio de cultivo.

Hipótesis

La actividad fosfatasa alcalina extracelular aumenta al transferir las diatomeas a un medio con una fuente organofosforada, luego de haber sido sometidas a estrés por carencia de P.

Materiales

- Cultivos en medio marino f/2 de una diatomea bentónica
- Medio f/2 completo y medio f/2 carente de P
- Solución de fosfato de *p*-nitrofenilo 1,2 mM
- Buffer Tris-HCl 0,1 M pH 8,5 preparado en agua de mar artificial
- Solución de NaOH 4N
- Cristalizadores
- Tubos Eppendorf
- Agitador rotatorio termostatzado (“shaker”)
- Balanza analítica
- Centrífuga para tubos Eppendorf
- Espectrofotómetro
- Cámara de flujo laminar
- Cámara fría con iluminador
- Pipetas automáticas
- Cámara de Neubauer
- Formol

Metodología

Para la medición de la actividad fosfatasa alcalina se utilizará el sustrato organofosforado artificial fosfato de *p*-nitrofenilo (pNPP) (Cao et al. 2009).

El fundamento del método consiste en que en medio alcalino, la fosfatasa hidroliza el sustrato orgánico fosfato de *p*-nitrofenilo dando como productos fosfato libre y el alcohol aromático *p*-nitrofenol, compuesto coloreado amarillo con un máximo de absorción a 410 nm (Figura 1). Si la concentración de sustrato empleada es tal que garantice la velocidad máxima de la reacción enzimática, la aparición de color será directamente proporcional a la actividad fosfatasa y se podrá medir con un espectrofotómetro.

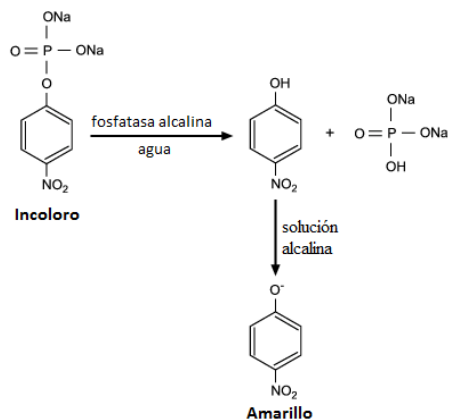


Figura 1: Fosfato de *p*-nitrofenilo como sustrato para la medición de la actividad fosfatasa alcalina

Procedimiento experimental

a) Pre-incubación: a cada grupo se le entregarán dos cristalizadores con cultivos de una diatomea bentónica. En la cámara de flujo laminar, se descartará el medio de cultivo y se lo reemplazará, en un caso, por 30 ml medio completo f/2 (control) y en el otro, por igual volumen de medio f/2 carente de fósforo (tratamiento).

Los cultivos se llevarán a la cámara fría y se incubarán en las condiciones habituales durante 7 días.

¿Por qué considera que es necesario prolongar la pre-incubación sin fósforo durante 7 días?

b) Cosecha de las células

Las células de los cultivos control y tratamiento se cosecharán por centrifugación a 2500 rpm durante 5 minutos a 15°C, a fin de preservar su integridad. Se re-suspenderán en 5 ml de buffer Tris-HCl 0,1 M pH 8,5.

Se tomarán alícuotas de 1 ml de cada una de las suspensiones celulares y se fijarán con formol al 4% para realizar el posterior recuento celular en cámara de Neubauer.

c) Medición de la actividad fosfatasa alcalina

A tubos Eppendorf conteniendo 113 μ moles de fosfato de *p*-NPP en buffer Tris-HCl 0,1 M pH 8,5, se agregarán alícuotas de volumen conocido de las suspensiones celulares dando inicio a la reacción. Se incubará a 37°C con agitación suave en el *shaker*. La reacción se detendrá a diferentes tiempos con el agregado de 100 μ l de solución de NaOH 4N (tiempos sugeridos de reacción: 20, 60, 90, 120, 150 y 180 minutos). Luego de centrifugar para clarificar la mezcla de reacción se leerá la absorbancia a 410 nm, utilizando como blancos la absorbancia de mezclas sin sustrato (pNPP) y sin enzima (sin suspensión celular). Todas las mediciones se harán por duplicado.

d) Cuantificación de los resultados

Siendo el coeficiente de extinción molar (ϵ) del fosfato de *p*-NPP de $18,5 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, se puede convertir la variación de absorbancia registrada en la cubeta del espectrofotómetro en concentración de producto (C), utilizando la ley de Lambert Beer como:

$$C = A/d$$

donde A corresponde al valor de absorbancia, y l, a la longitud de la cubeta (1 cm).

Así, la actividad enzimática, expresada en unidades enzimáticas por litro (UE l⁻¹) (y UE se define como la cantidad de enzima que hidroliza 1 μmol de sustrato por minuto), será:

$$\text{FosfatasaAlcalina (UE/L)} = \frac{\Delta\text{Abs} \cdot V_{\text{ensayo}} \cdot 1000}{\epsilon \cdot l \cdot V_{\text{muestra}}}$$

donde:

ΔAbs : Diferencia de absorbancia en el tiempo.

V_{ensayo} : Volumen final del ensayo (1 ml)

ϵ : Coeficiente de extinción molar ($18,5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)

l: Largo de cubeta de espectrofotómetro (1 cm)

V_{muestra} : Volumen de la suspensión celular utilizado

Los valores de actividad enzimática calculados según la fórmula anterior se relacionan al número de células por litro de las suspensiones celulares según el recuento en cámara de Neubauer.

e) Representación de los resultados

Los datos se registran en la tabla siguiente y se grafica la actividad enzimática en función del tiempo para control y tratamiento.

Tiempo	Control			Tratamiento		
	Abs	UE. l ⁻¹	UE. l ⁻¹ .cel ⁻¹	Abs	UE. l ⁻¹	UE. l ⁻¹ .cel ⁻¹
20						
60						
90						
120						
150						
180						

Discusión

¿Cuáles son los resultados esperados de esta experiencia? ¿Concuerdan los resultados obtenidos con los esperados? Señale diferencias y dé las posibles causas para las mismas. ¿Cómo mejoraría el diseño experimental?

¿Cómo progresó la actividad fosfatasa alcalina en función del tiempo?

Preguntas adicionales

Suponga que utiliza tiempos de pre-incubación en ausencia de fósforo de 2 y de 15 días. ¿Qué resultados esperaría observar? Explique.

Discuta sobre el papel de la fosfatasa alcalina en la osmotrofia. ¿Considera que la cuantificación de esta actividad enzimática puede ser un buen indicador del nivel de fósforo inorgánico en un cuerpo de agua? Explique.

Se ha comprobado que las diatomeas bentónicas migran en forma vertical dentro de los sedimentos siguiendo un ritmo circadiano sincronizado por las mareas y el ciclo diurno-nocturno. En la zona afótica de los sedimentos, rica en materia orgánica, suele ocurrir la división celular. En la capa fótica superior, rica en nutrientes inorgánicos, ocurre la fotosíntesis. Suponga que toma muestras de las capas fóticas superficiales y de las afóticas profundas y mide la actividad fosfatasa alcalina. ¿Dónde esperaría encontrar la mayor actividad enzimática? Explique.

Bibliografía

- Cao X, Song C, Zhou Y, Strojsová A, Znachor P, Zapomelová E, Vrba J. 2009. Extracellular phosphatases produced by phytoplankton and other sources in shallow eutrophic lakes (Wuhan, China): taxón-specific versus bulk activity. *Limnology* 10:95-104.
- Duhamel S, Björkman KM, Van Wambeke F, Moutin T, Karl DM. 2011. Characterization of alkaline phosphatase activity in the North and South Pacific Subtropical Gyres: implications for phosphorus cycling. *Limnol. Oceanogr.* 56:1244-1254.
- Glibert PM y Legrand C. 2006. The Diverse Nutrient Strategies of Harmful Algae: Focus on Osmotrophy. En: Edna Granéli and Jefferson T. Turner (Eds.). *Ecology of Harmful Algae*. Ecological Studies, Vol. 189: 163-175. Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- Whitton BA, Al-Shehri AH, Ellwood NTW, Turner BL (2005) Ecological aspects of phosphatase activity in cyanobacteria, eukaryotic algae and bryophytes. En: Turner BL, Frossard E, Baldwin DS (Eds.) *Organic Phosphorus in the Environment*. Commonwealth Agricultural Bureau, Wallingford, UK, 205-241.

DIAZOTROFIA EN CIANOBACTERIAS

La diazotrofia - capacidad de utilizar nitrógeno atómico como fuente de nitrógeno- es privativa de ciertos organismos procariontes, capaces de fijar nitrógeno atmosférico. El complejo enzimático de la nitrogenasa se inactiva totalmente en presencia de oxígeno. En el caso de las cianobacterias, organismos fotosintéticos oxigénicos, la fijación de nitrógeno puede ocurrir ya sea durante la noche, separándose de la fotosíntesis diurna que proveerá los esqueletos carbonados y la energía necesaria para el proceso o dentro de células especiales, de pared engrosada y carentes de pigmentos fotosintéticos, que son los heterocistos.

El objetivo del siguiente práctico consiste en la cuantificación del número de heterocistos presentes en cultivos de una cianobacteria pre-incubados en presencia y ausencia de nitrato en el medio de cultivo.

Materiales y métodos

- . Cultivo de cianobacteria
- . Erlenmeyers estériles
- . Medio BBM con y sin nitrato
- . Cámara de flujo laminar
- . Microscopio

Se toman dos submuestras de la cianobacteria provista por los docentes y se las coloca en sendos erlenmeyers conteniendo 25 ml aprox de medio de cultivo BBM con y sin nitrato.

Separar una muestra de la cianobacteria para proceder a su determinación.

Se incuban durante 15 días aprox.

Al cabo de ese tiempo, se vuelven a observar los cultivos y se determina la frecuencia de aparición de heterocistos en los filamentos.

Discusión

Compare los resultados obtenidos con los esperados y discuta.

¿Observa alguna diferencia morfológica entre los dos cultivos?

TRABAJO PRÁCTICO Nº 9

LAS ALGAS COMO BIOINDICADORES

Las preferencias de hábitat de las algas dan información sobre las características físico-químicas del cuerpo de agua en que viven. En este sentido, pueden ser usadas para establecer el estado de “salud” de un cuerpo de agua, presente o pasado o para seguir su evolución (biomonitorio). Las diatomeas y las clorofíceas son las más utilizadas como bioindicadores. Desde la década de los 70’s, a nivel mundial, se han desarrollado distintos tipos de índices bióticos, de relativamente fácil aplicación en monitoreos de rutina. Entre ellos figura el IDP (Índice de diatomeas pampeanas), desarrollado por Gómez & Licursi (2001).

$$\text{IDP} = \frac{\sum_{j=1}^n \text{Idp } j \text{ } A_j}{\sum_{j=1}^n A_j}$$

Donde:

Idp j = valor específico del índice obtenido para la especie *j* y **Aj** = abundancia relativa (%) de la especie *j*

El valor específico del índice para especies de diatomeas más frecuentes en el epipelon de arroyos de la provincia de Buenos Aires figura en la tabla adjunta.

OBJETIVO

El objetivo de este Trabajo Práctico es utilizar el IDP para comparar la calidad del agua en dos arroyos bajo diferente presión antrópica.

Materiales a emplear:

- Muestras de epipelon de distintos cuerpos de agua, fijadas en formol 4%
- Tubos de ensayos cónicos
- Micropipetas automáticas y sus correspondientes puntas
- Porta y cubreobjetos limpios y desengrasados
- Agua oxigenada 100%
- Agua destilada
- Tolueno
- Resina sintética
- Papel absorbente
- Guantes de vinilo

PROTOCOLO DE TRABAJO

Los alumnos se repartirán en dos grupos, cada uno de los cuales trabajará con muestras de epipelon diferentes. Previo a su tratamiento, las muestras se dejarán decantar por al menos 24 hs y se descartará el sobrenadante

a) oxidación de la materia orgánica según técnicas estándar (Battarbee, 1986)

- Tomar una submuestra con la pipeta automática, descartar el tip.
- Colocar la submuestra en un tubo de ensayos cónico

- Agregar H₂O₂ 50% con la pipeta automática y descartar el tip
 - Calentar a baño María en el horno de microondas durante 1´
 - Dejar enfriar
 - Lavar mediante sucesivas centrifugaciones, descartando el sobrenadante y reemplazándolo con agua destilada.
 - Llevar el contenido a 10 ml con agua destilada
 - Reservar tapado hasta la confección de los preparados permanentes
- b) **Confección de preparados permanentes:** cada grupo confeccionará sus preparados permanentes (al menos uno por persona).
- Montar una gota del material contenido en el tubo entre porta y cubreobjetos para verificar la concentración del material
 - Preparar la dilución más adecuada poniendo, en un tubo nuevo rotulado, un volumen conocido de muestra utilizando la pipeta automática (reservar el tip) y agregando la cantidad necesaria de agua destilada.
 - Con la pipeta automática, tomar 0,5 ml de la nueva suspensión y colocarlo sobre un cubreobjetos cuidadosamente desengrasado con alcohol 96°
 - Dejar secar a temperatura ambiente y protegido del polvo ambiental
 - Colocar una gota de resina en un portaobjetos desengrasado. Usar una varilla de vidrio limpia
 - Invertir el portaobjetos y tocar con la gota la superficie ya seca del cubreobjetos y levantar
 - Acercar a la llama del mechero no más de 3 segundos y apretar suavemente el cubreobjetos con un objeto de punta roma, para eliminar burbujas
 - Dejar enfriar sobre una superficie metálica o sobre hielo
 - Raspar la resina sobrante o limpiarla con un papel absorbente embebido en tolueno (en este caso usar guantes de vinilo)
 - Guardar en una caja porta preparados
 - Limpiar la resina de la varilla utilizando un papel embebido en tolueno (usar guantes de vinilo)
- c) **identificación y recuento:** los preparados permanentes se analizarán bajo microscopio óptico, dibujando y midiendo las primeras 100 valvas que aparecen. A partir de los dibujos y sus mediciones, se identificarán las especies utilizando la bibliografía disponible.
- d) **aplicación del índice IDP** Cada alumno volcará en una planilla de cálculo los datos de las especies identificadas, el valor específico del IDP y las abundancias relativas, con los que podrá aplicarse la fórmula del índice y se compararán los resultados obtenidos en ambos cuerpos de agua.

e) **informe**

Bibliografía

Battarbee, R. W. (1986). Diatom analysis. In B.E. Berglund (Ed.), *Handbook of Holocene Palaeoecology and Palaeohydrology* (pp. 527-570). John Wiley & Sons.

Edward G. Bellinger, & Sigeo, D. C. (2010). *Freshwater Algae- Identification and Use as Bioindicators* Wiley-Blackwell. 285 pp

Gómez, N., & Licursi, M. (2001). The Pampean Diatom Index (IDP) for assessment of rivers and streams in Argentina. *Aquatic Ecology*, 35, 173-181.

Tabla de valores de IDP para especies* de diatomeas pampeanas (Gómez & Licursi, 2001)

	Nivel de distribución	IDP para la especie
<i>Achnanthes delicatula</i> spp hauckiana Lange-Bertalot & Ruppe	II	2
<i>Ac. hungarica</i> (Grunow) Grunow	II-III	2,5
<i>Ac. lanceolata</i> (Bréb.) Grunow	I-II	1,5
<i>Ac. minutissima</i> Kützing v. <i>minutissima</i> Kützing	0-I	1
<i>Ac. exigua</i> Grunow	I	1
<i>Ac. inflata</i> (Kützing) Grunow	I-II	1,25
<i>Actinocyclus normanii</i> (Greg.ex Grev) Husted fa subsalsus	I-III	2,5
<i>Amphiprora alata</i> Kützing	II-III	2,5
<i>Amphora coffeaeformis</i> (Ag.) Kützing	III-IV	3,75
<i>Am. libyca</i> Ehrenberg	II-III	2,5
<i>Am. ovalis</i> (Kützing) Kützing	II-III	2,25
<i>Am. perpusilla</i> (Oestrup) Lange-Bertalot	I-II	1,75
<i>Am. veneta</i> Kützing	III-IV	3,5
<i>Anomoeoneis sphaerophora</i> (Ehr) Pfitzer	III-IV	3,25
<i>Aulacoseira ambigua</i> (Grunow) Simonsen	I-II	1,25
<i>Au. granulata</i> (Ehr) Simonsen	I-II	1,75
<i>Au. granulata</i> var <i>angustissima</i> (O.M) Simonsen	I-II	1,75
<i>Bacillaria paradoxa</i> Gmelin	I-II	1,75
<i>Caloneis amphisbaena</i> (Bory) Cleve	I-II	1,5
<i>Ca. bacillum</i> (Grunow) Cleve	I-II	1,5
<i>Ca. ventricosa</i> (Ehr. Donkin) Meister	I-II	1,5
<i>Ca. oregonica</i> (Ehr.) Patrick	I-II	1,25
<i>Campilodiscus clypeus</i> Ehr.	II-III	2,25
<i>Carpatograma crucicula</i> (Grun. Ex. Cl) Ross	I	1
<i>Cocconeis placentula</i> Ehrenberg	I-III	2
<i>Co. placentula</i> var. <i>euglypta</i> (Ehr.) Grunow	II-III	2,25
<i>Co. placentula</i> var. <i>lineata</i> (Ehr) Van Heurk	I-III	2
<i>Cyclotella meneghiniana</i> Kützing	II-IV	2,5
<i>Cyc. striata</i> (Kutz) Grunow	II	2
<i>Cyc. atomus</i> Hust.	III-IV	3,5
<i>Cymbella affinis</i> Kützing	I-II	1,75
<i>Cym. cistula</i> (Ehrenberg) Kirchner	I-II	1,25
<i>Cym. silesiaca</i> Bleisch in Rabenhost	I-II	1,75
<i>Cym. lanceolata</i> (Ehr.) Van Heurk	I-II	1,25
<i>Cym. minuta</i> Hilse ex Rabenhorst	0-I	0,5
<i>Denticula elegans</i> Kutz.	I-II	1,25
<i>De. kutzingii</i> Grunow	I-II	1,5
<i>Diploneis elliptica</i> (Kützing) Cleve	I	1
<i>Di. ovalis</i> Hilse (Cleve)	I-II	1,25
<i>Di. pseudovalis</i> Hustedt	I	1
<i>Di. puella</i> (Schumann) Cleve	I-II	1,25
<i>Diatoma vulgare</i> Bory	I-II	1,5
<i>Ellerbekia arenaria</i> (Moore) Crawford	II	2

	Nivel de distribución	IDP para la especie
<i>Epithemia sorex</i> Kützing	I-II	1,75
<i>Ep. adnata</i> (Kutz) Brebisson	I-II	1,25
<i>Eunotia bilunaris</i> (Ehr.) Mills	I-II	1,25
<i>Eu. circumborealis</i> Lange-Bertalot & Norpel	I	1
<i>Eu. curvata</i> (Kütz.) Lagerstedt	I	1
<i>Eu. monodon</i> Ehr.	I	1
<i>Eu. diodon</i> Ehrenberg	I	1
<i>Eu. faba</i> Grunow	I	1
<i>Eu. sudetica</i> O. Muller	I	1
<i>Eu. pectinalis</i> (Dyllwyn) Rabenhorst	I	1
<i>Eu. praerupta</i> Ehrenberg	I	1
<i>Eu. rabenhorstiana</i> (Grun.) Husted	I	1
<i>Eu. triodon</i> Ehrenberg	I	1
<i>Fragilaria ulna</i> (Nitzsch.) Lange-Bertalot	I-III	2
<i>Fr. capuccina</i> Desmaziers	O-1	0,5
<i>Fr. construens</i> (Ehr.) Grunow	I-II	1,5
<i>Fr. crotonensis</i> Kitton	I-III	2
<i>Fr. delicatissima</i> (W. Smith) Lange-Bertalot	I	1
<i>Fr. heidenii</i> Oestrup	I	1
<i>F. inflata</i> (Heiden) Husted	I	1
<i>Frustulia rhomboides</i> (Ehr.) De Toni	I	1
<i>Gomphonema pseudoaugur</i> Lange-Bertalot	I-II	1,25
<i>Go. angustum</i> Agardh	O-II	1
<i>Go. clavatum</i> Ehrenberg	I-II	1,25
<i>Go. gracile</i> Ehrenberg	I	1
<i>Go. parvulum</i> Kützing	II-IV	3,25
<i>Go. subclavatum</i> (Grun.) Grunow	I-II	1,25
<i>Go. truncatum</i> Ehrenberg	I-II	1,25
<i>Gyrosigma attenuatum</i> (Kutz) Cleve	II	2
<i>Gy. acuminatum</i> (Kutz) Rabenhorst	II	2
<i>Hantzschia amphioxys</i> (Ehr.) Grunow	I-III	2
<i>Ha. virgata</i> (Roper) Grunow	I-II	1,5
<i>Ha. virgata</i> var <i>capitellata</i> Hustedt	I-II	1,25
<i>Melosira varians</i> Agardh	I-III	2
<i>Me. arenaria</i> Moore ex Ralfs	I-II	1,25
<i>Me. lineata</i> (Dyllwyn)	I	1
<i>Me. roeseana</i> Rabenhorst	I	1
<i>Meridion circulare</i> (Greville) C.A. Agardh	O-1	0,25
<i>Navicula accomoda</i> Hustedt	III-IV	3,5
<i>Na. atomus</i> (Kütz) Grunow	III	3
<i>Na. capitata</i> Ehrenberg	I-III	2,75
<i>Na. capitata</i> var <i>hungarica</i> (GruNa.) Ross	I-III	2
<i>Na. capitatoradiata</i> Germain	I-II	1,25
<i>Na. confervacea</i> (Kutz) Grunow	II-III	2,75
<i>Na. cryptocephala</i> Kützing	I-IV	3
<i>Na. cuspidata</i> Kützing	II-IV	3
<i>Na. erifuga</i> Lange-Bertalot	I-II	1,75

	Nivel de distribución	IDP para la especie
<i>Na. gastrum</i> (Ehr.) Grunow	I-II	1,25
<i>Na. gregaria</i> Donkin	II-III	2,75
<i>Na. goeppertiana</i> (Bleisch) H.L. Smith	III-IV	3,75
<i>Na. halophila</i> (Grunow) Cleve	II	2
<i>Na. notha</i> Wallace	I-II	1,75
<i>Na. mutica</i> Kützing	III	3
<i>Na. peregrina</i> (Ehr.) Kützing	I-II	1,75
<i>Na. pupula</i> Kützing	II-IV	3
<i>Na. pygmaea</i> Kützing	II-III	2,75
<i>Na. radiosa</i> Kützing	I-II	1,25
<i>Na. rhynchocephala</i> Kützing	I-II	1,25
<i>Na. subminuscula</i> Manguin	III-IV	3,75
<i>Na. tripunctata</i> (O.F. Mull) Bory	I-III	2
<i>Neidium iridis</i> (Ehrenberg) Cleve	I	1
<i>Nitzschia dissipata</i> (Kütz) Grunow	I-II	1,25
<i>Ni. acicularis</i> (Kütz) Smith	III-IV	3,75
<i>Ni. amphibia</i> Grunow	I-III	2,5
<i>Ni. amphiboides</i> Hustedt	I-III	2,5
<i>Ni. angustata</i> Grunow	II-III	2,5
<i>Ni. brebissima</i> Grunow	II	2
<i>Ni. constricta</i> (Kützing) Ralfs	II-IV	3
<i>Ni. debilis</i> (Arnott) Grunow	II	2
<i>Ni. draveillensis</i> Coste & Ricard	I-II	2
<i>Ni. filiformis</i> (W. M. Smith) Van Heurk	I-III	2,25
<i>Ni. fonticola</i> Grunow	I	1
<i>Ni. frustulum</i> Kützing	I-II	1,75
<i>Ni. flexa</i> Schumann	I-II	1,25
<i>Ni. gracilis</i> Hantzsch	I-II	1,5
<i>Ni. heufferiana</i> Grunow	I-II	1,25
<i>Ni. hungarica</i> Grunow	II-III	2,75
<i>Ni. levidensis</i> (W. Smith) Grunow	II-III	2,5
<i>Ni. linearis</i> (Ag.) W.M. Smith	II-III	2,5
<i>Ni. microcephala</i> Grunow	III	3
<i>Ni. paleacea</i> (Grunow) Grunow	II-III	2,75
<i>Ni. nana</i> (Grunow)	I-II	1,25
<i>Ni. palea</i> (Kützing) W. Smith	II-IV	3,75
<i>Ni. sigma</i> (Kützing) W. M. Smith	II-IV	3
<i>Ni. sigmoidea</i> (Nitzsch.) W.M. Smith	II-IV	3
<i>Ni. spectabilis</i> Gregory	I-II	1,75
<i>Ni. supralitoreia</i> Lange-Bertalot	II-III	2,75
<i>Ni. litoralis</i> Grunow	II-III	2,75
<i>Ni. recta</i> Hantzsch ex Rabenhorst	I-II	1,75
<i>Ni. umbonata</i> (Ehr.) Lange-Bertalot	III-IV	3,75
<i>Ni. brevissima</i> Grunow	II	2
<i>Ni. vermicularis</i> (Kützing) Hantzsch	III	3
<i>Opephora martyi</i> Heribaud	I-II	1,25
<i>Orthoseira roeseana</i> (Rabh) Ehrenberg	II	2

	Nivel de distribución	IDP para la especie
<i>Pinnularia acrosphaeria</i> Rabenhorst	I-II	1,25
<i>Pi. borealis</i> var <i>rectangularis</i> Carlson	I-II	1,25
<i>Pi. braunii</i> (Grunow) Cleve	I-II	1,25
<i>Pi. interrupta</i> W. M. Smith	I-II	1,25
<i>Pi. gibba</i> Ehrenberg	I-III	2,5
<i>Pi. gibba</i> (Ehr) var <i>linearis</i> Hust.	I-II	1,5
<i>Pi. maior</i> (Kütz.) Rabenhorst	I-II	1,25
<i>Pi. microstaurum</i> (Ehr.) Cleve	I-III	2,5
<i>Pi. subcapitata</i> Gregory	I-II	1,75
<i>Pi. viridis</i> (Nitz) Ehrenberg	I-II	1,75
<i>Pleurosira laevis</i> (Ehr.) Compere	I-II	1,5
<i>Reimeria sinuata</i> (Gregory) Kociolek & Stoermer	0-II	0,75
<i>Rhoicosphenia abbreviata</i> (Ag) Lange-Bertalot	0-II	1,5
<i>Rhopalodia brebissoni</i> Krammer	I-II	1,25
<i>Rh. gibba</i> (Ehr) O. Müller	I-II	1,25
<i>Rh. gibberula</i> (Ehr.) O. Müller	I-II	1,25
<i>Rh. musculus</i> (Kütz) O. Müller	I-II	1,5
<i>Stauroneis phoenicenteron</i> (Nitzsch.) Ehrenberg	II-III	2,25
<i>Stenopterobia curvula</i> (W. Smith) Krammer	I	1
<i>Stephanodiscus minutulus</i> (Kütz.) Cleve et Moller	II-IV	3,5
<i>St. hantzschii</i> Grunow	II-IV	3,5
<i>Surirella angusta</i> Kutzing	II-III	2,5
<i>Su. tenera</i> Gregory	I-II	1,5
<i>Su. biseriata</i> Brébisson	I-II	1,25
<i>Su. brebissonii</i> Krammer & Lange-Bertalot	I-III	2
<i>S linearis</i> W. M. Smith	I-II	1,25
<i>Su. ovalis</i> Brébisson	II-III	2,5
<i>Su. tenera</i> Gregory	I-II	1,75
<i>Thalassiosira haslae</i> Cassie & Dempsey	III	3

- Los nombres de algunas de los géneros y las especies pueden haber variado en los últimos 10 años.

TRABAJO PRÁCTICO N° 10

DIVERSIDAD Y SISTEMÁTICA ALGAL

Objetivos

El objetivo de este T.P. es el estudio de la diversidad biológica de los diferentes grupos de algas, a partir de la observación y el análisis de las estructuras vegetativas y reproductivas, así como del estudio de su sistemática.

Materiales

- portaobjetos
- cubreobjetos
- agujas de disección
- pinzas de punta fina
- papel absorbente
- papel de arroz o gamuza natural para limpieza de objetivos
- hojas de afeitar
- trapo de algodón o repasador
- carpeta con papel blanco liso (preferiblemente A4)
- lápiz de punta fina o portaminas 0,5 mm
- goma de borrar

Procedimiento

Se trabajará, durante varias clases prácticas, con materiales representativos de los diferentes taxones con el objeto de conocer las características básicas de cada grupo. Esta tarea incluirá la determinación genérica de los organismos, utilizando para ello las claves dicotómicas correspondientes.

Una vez cumplimentado esto, se trabajará en la determinación a nivel específico, para lo cual el alumno contará con la bibliografía científica adecuada para cada grupo taxonómico. Esta etapa se realizará especialmente durante las clases de determinación.

Organización de la información

Esta consistirá de dibujos detallados de los materiales observados, más la siguiente información:

- clasificación taxonómica
- magnificación
- estructuras rotuladas
- diagnóstico
- origen de la muestra
- observaciones y/o comentarios adicionales (aplicación práctica, indicador biológico, etc.)
- bibliografía consultada