

OBSERVACIONES BIOLÓGICAS DE *CHLOROCOCCUM INFUSIONUM*¹

POR S. A. GUARRERA

ABSTRACT

Biological observations on «*Chlorococcum infusionum*». — In a short introduction, the author points out the absolute necessity of basing all studies on algae on pure cultures of the species. A short historical resúmen is added.

Of all the nutrient media employed, he considers that of Detmer to be superior; this medium solidified with agar permitting him to obtain pure cultures of *Chlorococcum infusionum*.

Based on these cultures, he makes a morphological study of the alga. He also employed carbon dioxide, glucose and sodium meta-vanadate, which added to the medium stimulated growth. In similar manner, he tried ammonium salts and nitrogen of organic origin, observing similar growth stimulation only in the case of dipeptide glycyl-glycine.

INTRODUCCIÓN

Coincidiendo con la mayoría de los autores modernos podemos afirmar que, en general, los distintos estados o fases del desarrollo de las algas, como así también su comportamiento frente a determinadas sustancias, sólo pueden ser definitivamente establecidas, cuando el estudio de las mismas se realiza en cultivos puros. La necesidad de realizar de esta manera, la investigación de estos organismos tan numerosos como interesan-

¹ Tesis para optar al grado de doctor en Ciencias Naturales, en la Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales de la Universidad de Buenos Aires.

tes, no es difícil de comprobar, sobre todo para aquellos que cultivan la algología como disciplina científica. Podríamos agregar que, aún para los sistemáticos, el conocimiento genérico o específico hace necesario, en muchos casos, conocer ciertos estados de las algas, así como también formas de reproducción, de resistencia, etc. Para tal fin es de suma importancia realizar el cultivo, o en caso contrario correr el riesgo de que esos detalles tan importantes, queden supeditados a una revelación casual, no siempre fácil de hallar o interpretar. Pero si bien en un trabajo de sistemática y en el caso de algunas especies, puede prescindirse del cultivo puro, para los estudios de citología, genética, fisiología, morfología, polimorfismo, etc., resultan absolutamente necesarios. De esta manera se evitan las confusiones a que conducen frecuentemente estos organismos, cuya morfología, formas de reproducción, etc., son muchas veces de increíble parecido.

I. BREVE HISTORIA SOBRE LOS CULTIVOS ALGOLÓGICOS

Los estudios de algología experimental, se iniciaron con algunos visos de seguridad hace más o menos 55 años. Lo que hasta entonces y en esa época se había realizado, eran observaciones más o menos afortunadas, efectuadas por botánicos interesados por conocer la evolución de algunas especies. Según Kufferath (1930) para muchos de ellos (Klebs, Artari, Richter) multiplicar las algas en una infusión era realizar un cultivo y si de ellas aislaban una sola célula, consideraban haber realizado un cultivo puro.

Con Beijerinck (1890) y Miquel (1897) comienza, podemos decir, la era de los cultivos puros. Este último autor fundaba su método en el aislamiento por dilución y fraccionamiento, para lo cual calculaba la cantidad de individuos de las distintas especies, que vivían en un centímetro cúbico del agua a estudiar, es decir, realizaba un examen cuali-cuantitativo. Luego, diluía el líquido original en un volumen determinado de agua, de manera de obtener un organismo cada dos centímetros cúbicos, sembrando posteriormente medio centímetro de

esta suspensión, en cada uno, de una serie de tubos conteniendo sustancias nutritivas. Algunos tubos daban desarrollo de algas y otros permanecían estériles. De esta manera Miquel pudo observar la formación de auxosporas en varias especies de diatomeas. Según Kufferath, con el método de este autor sólo se pueden conseguir cultivos unialgales. De cualquier modo, el gran mérito de los trabajos de Miquel reside en que echaron la base de la algología experimental y además, por ser uno de los primeros, en reconocer la necesidad de los estudios basados en el cultivo puro. Con respecto a estos últimos, son muchos los autores que han aportado ideas y métodos para poder obtenerlos. Entre ellos podemos citar a Chodat (1900), quien preconiza el empleo del método de las diluciones perfeccionado por él, y que dió tan buenos resultados para las *Chlorophyceae*.

Kufferath, señala que Klebs en 1896 aconsejaba para los aislamientos, las variaciones luminosas como método para obtener a voluntad zoosporulación y a partir de éstas, la obtención de cultivos puros. Además, otros investigadores aconsejaron la centrifugación, como un recurso para aislar las algas de las bacterias.

En lo que se refiere a la denominación de cultivo puro, veremos que ésta fué utilizada frecuentemente, aunque no siempre ajustada a la verdad de los hechos. A tal efecto es interesante reproducir aquí la opinión que sobre los mismos ha dado el algólogo contemporáneo Kufferath *loc. cit.*, quien en dicho trabajo señaló el error o la falta de un criterio acabado que sobre aquel concepto tenían algunos investigadores.

Este autor, refiriéndose a Pringsheim, quien indica para los cultivos las siguientes etapas:

I. Erhaltungskultur	Cultivo de entretenimiento
II. Rohkultur	» bruto
III. Anhängungskultur	» de enriquecimiento
IV. Art Reinkultur	» unialgal
V. Absolut Reinkultur	» puro
VI. Einzellkultur	» clonal

dice, que además de no ser muy claras algunas de ellas, asegura que la mayoría de los que trabajaron después de él no se

han ceñido a las mismas, por considerarlas inconvenientes o engorrosas; además, él mismo, define el cultivo puro como «aquel que no encierra más que una sola especie de alga con exclusión de todo otro organismo», pero que después, dicho autor agrega: «en los cultivos, la ausencia de microorganismos extraños no es indispensable». Esta afirmación hace dudar a los demás investigadores de la absoluta pureza de los cultivos de Pringsheim.

Con respecto a Palladine, manifiesta que este autor habla de cultivos puros, y que en la parte donde se refiere a la respiración y fermentación realizadas por las algas, asegura que debido a la corta duración de las experiencias — varias horas — las infecciones bacterianas sólo permiten una acción mínima que no varía los resultados.

Refiriéndose a Dill, que estudió el género *Chlamydomonas*, asegura que no lo hizo en cultivo puro, pues éste, como así también Dangeard, trabajaron en las mismas condiciones que Pringsheim.

Entre los algólogos que aplicaron celosamente el método del cultivo puro merece citarse Chodat (1893), (1894) y (1900) de cuya extensa bibliografía, sólo hemos podido consultar unos pocos trabajos. Afirmaba Chodat que muchos de los investigadores que se dedicaron a estos estudios, no han hecho otra cosa que cultivos unialgales, donde junto al alga problema se desarrollaban hongos y bacterias. Este botánico, partidario ferviente del cultivo puro, solamente admitía excepciones en un reducido campo de estas investigaciones, diciendo «en los casos en que los organismos que se estudian son relativamente bien caracterizados, de tal modo que se los puede reconocer a cada instante, éstos no necesitarán ser aislados». «En cambio no sucede lo mismo en los seres muy variables, que manifiestan una serie de estados evolutivos que se pueden llamar metamorfosis. Se impone en estos casos, para no llegar a conclusiones erróneas, el estudio basado en el cultivo puro y se tendrá así la certeza de haber eliminado uno de los factores más importantes de cometer error». Radais (1900), que se ocupó de estudiar las algas en cultivos puros, da un método para realizar la aereación de los mismos en condiciones asépticas.

Charpentier (1903), estudiando el *Cystococcus humicola*, se ocupó de la asimilación del carbono, dando en ese trabajo un método para la obtención de cultivos puros bacteriológicamente hablando.

Vischer (1926) realizó, a partir de cultivos puros, varios estudios, entre ellos: el del poliformismo que presentan ciertas especies de algas en diferentes medios nutritivos; la influencia de la sacarosa en la formación de filamentos, etc. También estudió el efecto que producen ciertos cationes o aniones en el crecimiento de las algas y estableció una relación entre la coherencia de las células y la naturaleza físico-química del medio.

Sin embargo, hay autores que se oponen al método del estudio de las algas en cultivo puro, sosteniendo que los medios artificiales en que se realizan, sustraen al organismo de la lucha por la vida. Además, los alimentos que proporcionan estos medios nutritivos nunca pueden ser tan completos como los naturales, dado que a las sales que los suelos contienen, se suman las sustancias orgánicas que se liberan con la descomposición de vegetales y animales.

En cambio, Kufferath es partidario del cultivo puro y afirma que éste permite realizar con la corrección deseada, el análisis de las condiciones biológicas y morfológicas más variadas y penetrar mejor, como aún no se ha podido hacer hasta ahora, en los vastos problemas de la citología y de la fisiología. A los estudios que realizaron anteriormente otros autores, en condiciones diferentes (no puro), este autor los considera como etapas sucesivas para alcanzar el concepto que hoy tenemos de cultivo puro.

II. MÉTODOS DE INVESTIGACIÓN EMPLEADOS

1. *Obtención del material de la naturaleza.* — En el año 1939, con motivo de una excursión botánica llevada a cabo en la isla de Martín García, tuvimos oportunidad de coleccionar material algológico, que fijado sobre el terreno con líquidos especiales, llevamos de vuelta a Buenos Aires en frasco de vidrio común. Con la idea preconcebida de realizar algunos cultivos de estos

organismos, trajimos varias muestras con algas vivas comenzando la tarea con el género *Spirogyra*, que en esos momentos se hallaba en conjugación, para lo cual preparamos varios líquidos nutritivos que repartimos en frascos de Erlenmeyer en cantidades no mayores de 100 mililitros. Efectuamos las siembras en dichos recipientes y varios días después, en dos de los frascos, en que habíamos colocado los líquidos de Kuster y Charpentier, aparecieron en la superficie de los mismos unas manchas de color verde claro, en forma de películas tenues, que una semana después las cubrían por completo. La rapidez con que se produjo este proceso de multiplicación, nos hizo entrever la posibilidad de abordar con mejor éxito el estudio de esta nueva alga, abandonando por el momento el cultivo primitivo. La observación microscópica nos reveló que se trataba de una *Chlorophyceae*, perteneciente al género *Chlorococcum*.

Pasado algún tiempo, remitimos varios tubos conteniendo cultivos puros al conocido ficólogo norteamericano doctor F. Drouet, para la determinación específica, quien nos comunicó que según él se trataba de *C. infusionum* (Schrank) Menegh.

Posteriormente, obtuvimos esta especie también en los ríos de la Plata y Paraná, aunque no frecuentemente.

2. *Medios de cultivo*. — Con el objeto de disponer de abundante material para el estudio y lograr posteriormente el aislamiento del organismo, ensayamos distintos medios de cultivos. Entre los preconizados por los diversos autores para el estudio de las *Chlorophyceae* y que hemos utilizado, podemos citar:

Medio de Kuster (Apud Kufferath)

Agua	100 ml
NO_3NH_4	0,01 g
Cl_2Ca	0,005 g
PO_4HK_2	0,005 g
$\text{SO}_4\text{Mg} \cdot \text{H}_2\text{O}$	0,005 g
Cl_3Fe	vestigios

Medio de Charpentier

Agua.....	1000 ml
NO ₃ K.....	2,00 g
PO ₄ K ₂ H.....	2,00 g
(NO ₃) ₂ Ca.....	0,05 g
SO ₄ Mg.....	1,00 g
SO ₄ Fe.....	vestigios

Medio de Detmer (Apud Kufferath)

Agua.....	1000 ml
(NO ₃) ₂ Ca.....	1,00 g
PO ₄ KH ₂	0,25 g
SO ₄ Mg.....	0,25 g
KCl.....	0,25 g
Cl ₃ Fe.....	vestigios

Medio de Iggena

Agua bidestilada.....	100 ml
NO ₃ K.....	0,20 g
PO ₄ HK.....	0,02 g
SO ₄ Mg (7H ₂ O).....	0,01 g
SO ₄ Fe.....	0,005 g

La técnica de preparación de éstos es sencilla, ya que se disuelven las sales en agua corriente en los tres primeros casos y en agua bidestilada en el último.

En todos los casos, la esterilización la efectuamos a 120° C durante 20-30 minutos, el pH se llevó a 7 con solución de hidróxido de sodio, y en los casos en que se produjo precipitado, filtramos el líquido y volvimos a esterilizar. Los líquidos los repartimos en tubos o frascos de Erlenmeyer, poniendo en los primeros 15 ml de medios y en los otros 30 ml.

Para los aislamientos utilizamos estos mismos medios pero solidificados por el agregado de agar 2 %, que previamente lavamos siguiendo la técnica siguiente: unos 100 g de agar lo colocamos en un frasco de boca ancha de 10 litros de capacidad, dispuesto de manera de permitir que el agua proveniente de una canilla, pudiera lavar el mismo continuamente, durante

varios días. Posteriormente pasamos varias veces por agua destilada, cambiando la misma 2 veces por día, dejándola finalmente escurrir. El agar así obtenido, lo colocamos bien extendido sobre una fuente en una estufa, con el objeto de deshidratarlo. Los medios nutritivos ya descriptos los solidificamos con este agar y una vez esterilizados los repartimos en cajas de Petri o en tubos de ensayo, disponiéndolos en este caso, en pico de flauta.

3. *Enriquecimiento*. — En los medios de cultivos líquidos realizamos las siembras del material que contenía la especie en estudio, mezclada con *Spirogyra*, otras *Chlorophyceae* y gran número de bacterias. La cantidad de medio de cultivo fué de 15 a 30 ml por tubo o por Erlenmeyer respectivamente, y el volumen de las siembras 1 ó 2 ml respectivamente. El período de incubación se prolongó por espacio de unos 15 a 20 días en el medio de Detmer (en los otros fué necesario dejarlos más tiempo), a la temperatura ambiente y disponiendo los cultivos de manera de recibir la luz solar difusa, a través de una ventana orientada hacia el NE. El desarrollo pudimos observarlo en muchos casos a simple vista a los 8 días, en forma de una película verde sumamente tenue, que flotaba en la superficie del medio, y que días después se prolongaba hacia arriba y abajo de la misma, adhiriéndose a las paredes de los tubos, o de los Erlenmeyer y luego difundiéndose en todo el líquido. Posteriormente el alga se multiplicó de tal manera, que el agua adquirió una coloración verde intensa. Si bien todos los medios utilizados resultaron adecuados para el desarrollo del *C. infusionum*, nos decidimos a utilizar preferentemente el de Detmer, por realizarse en éste un desarrollo más rápido y vigoroso.

4. *Aislamientos*. — En la introducción de este estudio hicimos resaltar la necesidad de trabajar con cultivos puros. Pero para alcanzar los mismos es necesario e imprescindible, en la mayoría de los casos, pasar por una etapa previa que es la obtención de los cultivos unialgales, ya que en la Naturaleza es excepcional encontrar una especie que se desarrolle aislada de las demás, pues en general viven juntas muchas de ellas.

5. Cultivos.

a) *Cultivo unialgal*. — Se entiende por cultivo unialgal, el desarrollo en medio artificial de una sola especie. Se diferencia del cultivo puro, en que éste se refiere a la obtención del alga, con exclusión total de otros organismos, entre ellos los hongos y las bacterias que son los más difíciles de eliminar.

Técnica para la obtención de cultivos unialgales.

Se pueden distinguir dos métodos principales: uno, el de las diluciones y fraccionamiento, que utiliza medios líquidos, y el otro, de aplicación general en bacteriología, que recurre al uso de los medios sólidos. Con frecuencia, y de acuerdo a las circunstancias, es posible combinar ambos métodos a fin de obtener resultados más rápidos y seguros. El primero consiste, de acuerdo a las directivas de Miquel (1898) en lo siguiente: de un agua que contiene algas se realiza un examen cuali-cuantitativo, con el objeto de establecer el número de organismos de cada especie contenido en un ml, y de acuerdo a esto se diluye aquélla hasta obtener 1 organismo cada dos ml. Luego se siembran 20 tubos conteniendo líquidos nutritivos, con medio ml de la suspensión y se incuban. Teóricamente deberán resultar 5 frascos fértiles y 15 estériles.

El segundo método, o sea el que utiliza medios sólidos, consiste en extender con un ansa de platino flameada, una gota de una suspensión de algas, sobre la superficie de un medio solidificado, dispuesto en una placa de Petri, la cual se incubaba en la misma forma que los medios líquidos, pero evitando en lo posible su desecamiento y contaminación.

Para realizar los aislamientos es necesario en la mayor parte de los casos realizar la suspensión a partir de cultivos de enriquecimiento; ahora bien, si el material recogido en la Naturaleza es abundante, se hace el aislamiento directamente partiendo de una suspensión de ese material.

Medio líquido. — Iniciamos los ensayos siguiendo el método de Miquel, pero a pesar de realizar varios intentos no pudimos obtener el desarrollo de nuestra alga.

Medio sólido. — Utilizamos los medios indicados anteriormente pero solidificados con agar. Las siembras, las realizamos a partir de un cultivo de enriquecimiento en medio líquido de Detmer,

sin dilución previa, pues utilizamos el material que flotaba en la superficie del líquido, constituido en su mayor parte por zoosporas. Sembramos 6 placas en los medios sólidos indicados, incubándolas durante 15-25 días en la vitrina que se indica, en lam. I, colocada frente a una ventana orientada al NE y con luz difusa. Uno de los inconvenientes fué la contaminación de las placas producida por las esporas de los hongos, que en gran número y en cualquier parte, se las suele hallar y que por la facilidad con que se dispersan, es posible que al abrir o cerrar las puertas de la vitrina, se pongan en movimiento y puedan caer sobre los medios sólidos. El desarrollo de las esporas se realiza a veces con tal rapidez que llegan a entorpecer el crecimiento y el aislamiento ulterior del *Chlorococcum infusionum*. Sin embargo, ese inconveniente lo subsanamos en parte, limpiando la vitrina que contenía los cultivos, con alcohol iodado, cada 8 días. Otra dificultad que se nos presentó, fué la deshidratación del medio producida por el prolongado período de incubación y que evitamos manteniendo un ambiente saturado de humedad dentro de la vitrina, para lo cual fué suficiente colocar en su interior, un recipiente de gran superficie lleno de agua y conseguir además un cierre hermético de la misma.

Obtención de los cultivos unialgales. — El desarrollo de *C. infusionum* fué visible a simple vista después de los 8 días, apareciendo en la superficie del medio como unos puntos de color verde. La observación microscópica nos reveló que se trataba de acumulaciones o agregados celulares, aproximadamente circulares, cuyo centro estaba formado por varios estratos de células, las cuales disminuían hacia los bordes. El aislamiento lo postergamos sin embargo hasta los 20 días, pues la observación de estos agregados, al cabo de una semana, no lo consideramos suficiente testimonio, para asegurar la obtención de cultivos unialgales a partir de los mismos. Este período de tiempo es necesario, pues permite un mayor desarrollo de las algas y al mismo tiempo una mejor diferenciación con aquellas especies que, eventualmente, podrían desarrollar junto a la primera. Pasado este tiempo, seleccionamos con una lupa aquellas acumulaciones que se presentaban más vigorosas y más ale-

jadas de organismos extraños, marcando con un lápiz graso el sitio en que se encontraban. Luego, con un ansa recta pescamos algunos de estos agregados, que diluimos en 0,5 ml de agua estéril, tratando de hacer la suspensión lo más homogénea posible y volvimos a sembrar nuevamente en medio sólido. Esta operación la realizamos por etapas sucesivas, varias veces, haciendo en cada caso las observaciones microscópicas correspondientes, lo que nos permitió comprobar la igualdad en la forma de los agregados celulares, sus dimensiones, el tiempo de crecimiento, su multiplicación, posición de cromatoforo y pirenoide, etc.; y llegar a la conclusión de que se trataba de una sola especie. También pudimos obtener su aislamiento utilizando el micromanipulador de Soriano (1935). Elegimos el agregado celular, en la misma forma que para el aislamiento anterior y absorbiéndolo luego con una fina pipeta, realizamos la suspensión que nuevamente sembramos en placas de Petri. Este segundo método de aislamiento, nos resultó más preciso y nos permitió obtener más rápidamente el cultivo unialgal deseado.

b) *Cultivo puro*. — El concepto de cultivo puro fué dado cuando se trató de cultivos uniales (véase pág. 269).

Obtención de los cultivos puros. — Utilizamos dos métodos, siendo el primero de ellos el siguiente: a partir de los cultivos uniales en medio sólido, realizamos varias suspensiones en tubos de centrifuga esterilizados, conteniendo 5 ml de agua en igual estado y cerrados con tapones de algodón; después de agitarlos con el objeto de disgregar bien los agregados celulares y permitir así un lavado más íntimo de cada célula, los centrifugamos a marcha regular durante tres minutos. Al cabo de este tiempo, las algas se hallaban en el fondo de los tubos y pudimos separar el líquido por medio del sifonado aséptico. A las algas que quedaron en el fondo de los tubos volvimos a diluirlas con agua estéril, centrifugándolas nuevamente. Esta operación la repetimos varias veces, sembrando al final de cada sifonado en medios sólidos. El objeto de la centrifugación era separar por diferencias de densidad las algas de las bacterias, las cuales por su menor densidad debían quedar flotando en la masa del líquido. Sin embargo, como la contaminación bacteriana continuaba, este procedimiento fué abandonado.

El siguiente método fué realizado siguiendo las directivas de Schramm (1914), para las algas que forman zoosporas, con excelente resultado; de cultivos unialgales en medio líquido, tomamos una porción con ansa, en el momento en que predominaban las zoosporas en la superficie de aquél y la suspendimos en 1 ml de agua estéril. De dicha suspensión sembramos varias placas que contenían medio sólido de Detmer y después de incubarlas durante unos días en las mismas condiciones que el cultivo unialgal y habiendo adquirido los agregados celulares un diámetro de más o menos 0,5 mm, los examinamos con una lupa binocular con el objeto de seleccionar alguno que se desarrollaba aislado, marcando su situación con lápiz graso. Luego pescamos el agregado celular con el micromanipulador de Soriano. Las algas así obtenidas tienen la ventaja de no contaminarse con las bacterias que desarrollan cerca de ellas, pues la pesca no se realiza por arrastre como sucede frecuentemente cuando se trabaja con ansa, sino que por el contrario, se obtiene por succión, sumergiendo la micropipeta dentro del agregado celular. Obtenidas de esta manera, las depositamos en un pequeño tubo de ensayo estéril que contiene 1 ml de agua o medio de Detmer líquido, también esterilizado, soplando suavemente por el extremo opuesto. Agitamos el tubo hasta conseguir una buena suspensión, sembrando las algas en forma similar a la anterior. Repetimos esta operación varias veces en forma sucesiva, es decir, partiendo de los últimos cultivos, hasta la obtención del alga al estado puro, es decir, exenta de todo otro organismo (véase lámina II). La prueba de esta pureza la realizamos al final de cada operación, haciendo las siembras en agua peptonada y a la obscuridad hasta que resultaron negativas.

A los efectos de mantener las cepas puras, es conveniente pasar a tubos con medio sólido dispuesto en pico de flauta y cerrados como de costumbre con algodón (véase lámina I). Los cultivos en medio sólidos deberán repicarse cada 30-40 días, mientras que en los medios líquidos pueden dejarse más tiempo. A fin de evitar la deshidratación del medio, es necesario en el primer caso agregar cada 10-15 días una gota del medio nutritivo líquido o agua esterilizada.

III. MORFOLOGÍA DE C. INFUSIONUM

CHLOROCOCCUM Fries, 1825Del griego: *χλωρος* = verde y *κόκκος* = esfera, baya.

La descripción original de este género, fundado por Fries, *Syst. Orbis Vegetabilis* I Lund (1825) 356, no la hemos podido consultar. Sólo la conocemos a través de un trabajo de Bold (1930), quien dice que en aquella obra, aparece esta corta diagnosis:

« A. *Chlorococcum* — Granula libera, minima, colorata, (Virdia 1, rubra) absque gelatina » sin que el autor cite ninguna especie.

A continuación transcribimos la descripción de West (1932):

Chlorococcum Fries, 1825 (incl. *Cystococcus* Nägeli, 1849). Células esféricas o, cuando están amontonadas formando estratos, muchas veces angulares como resultado de la presión mutua; terrestres o acuáticas. Cloroplasto parietal de forma acampanada o casi completamente esférico, comúnmente con un pirenoide central (varios en las células viejas); membrana relativamente delgada. Células al principio uninucleadas, después multinucleadas. Reproducción por zoosporas biciliadas (8-32 por células) o aplanosporas; zoosporas que a veces se desempeñan como gametas. Se conocen también acinetas con una espesa membrana y llenas de aceite coloreado de anaranjado ».

« Esta diagnosis concuerda con las características de las algas que han sido referidas comúnmente al Género *Chlorococcum* en los últimos años, aunque ninguno de los detalles de estructura celular mencionados se encuentran en la descripción de Fries. Al usar este nombre genérico se le adjudica por lo tanto un sentido especial que el autor difícilmente hubiese querido darle. La primera figura, algo satisfactoria de este Género es la del *Chlorococcum infusionum* publicado por Meneghini en el año 1842; y aunque en ella faltan detalles, no cabe duda que el cloroplasto es parietal y que ocupa prácticamente toda la periferia de la cé-

lula. En 1849 Nägeli describió otra especie (terrestre) y le dió el nombre de *Cystococcus humicola*; sus figuras son apenas mejor que las de Meneghini, aunque se reconoce el pirenoide y se dan detalles originales en el texto. Como el dibujo y la descripción de Meneghini son anteriores a la de Nägeli, el nombre genérico *Chlorococcum* tiene prioridad sobre el de *Cystococcus*».

«De Toni (1889) incluye el género *Chlorococcum* Fries (1825) y *Cystococcus* Näg. (1849) en el género *Protococcus* Ag. (1824), con el cual él los considera sinónimos. Recientes investigaciones de Wille sobre los especímenes originales del profesor C. A. Agårdh en el Museo Botánico de Lund, muestran sin embargo que el *Protococcus viridis* Ag. es idéntico con el alga posteriormente descrita como *Pleurococcus Nägeli* Chod. y que la diagnosis de De Toni de *Protococcus viridis* Ag., de incluir *Chlorococcum humicola* (Näg.) Rab. es completamente errónea, puesto que la formación de zoosporas biciliadas ha sido definitivamente establecida en esta última especie».

El género *Chlorococcum*, posee dispersión mundial, es sub-aéreo y se lo puede hallar preferentemente en aguas dulces, sobre tierra húmeda, paredes de ladrillo, etc. Según Printz (1927) hasta el presente han sido citadas alrededor de 26 especies para todo el mundo; en Argentina se conocen hasta el momento 4 especies, entre ellas *C. infusionum*, que ha sido citada para Buenos Aires y Córdoba. Por nuestra parte la hemos hallado en la Isla de Martín García y en los ríos de la Plata y Paraná. Como esta especie también ha sido citada para Europa y Norteamérica, se puede pensar que se trata de una especie cosmopolita.

Desarrollo y reproducción. — Con los cultivos puros obtenidos con la técnica descrita anteriormente, iniciamos las observaciones de los estados de crecimiento. Estos ensayos los efectuamos a partir de una célula madre, aislada con el micromanipulador Chambers, de una suspensión muy diluída del alga¹. La técnica utilizada fué la corriente con esta clase de aparatos, debiéndose señalar únicamente, que dicha operación requiere para ser llevada a cabo con éxito, un cuidadoso y prolongado

¹ A estos cultivos se los llama *clonales*.

ejercicio. Una vez aislada la célula en la micropipeta la pasamos a una gota de medio de Detmer, dispuesta sobre un porta excavado (gota pendiente). Durante el período de observación que se prolongó por unos 10-12 días, la preparación se mantuvo perfectamente cerrada, para evitar la evaporación, para lo cual se envaselinó el borde de la excavación del porta-objeto, con el propósito de que el margen del cubre-objeto quedara perfectamente adherido, y se lo expuso a la luz, en forma análoga a los megacultivos. En los tres o cuatro primeros días, observamos las zoosporas moverse en forma brusca en el interior de la célula madre, pero paulatinamente en los días sucesivos, esta movilidad se fué perdiendo hasta anularse. Mientras tanto, la célula madre se rodeó de una espesa membrana, como sucede cuando se cultivan estas algas en substratos demasiado deshidratados, y su color verde desapareció por completo en pocos días, comenzando al fin la desintegración. A pesar de repetir los ensayos, no logramos resultados satisfactorios, es decir, multiplicación de las células madres. Tampoco tuvimos éxito en experiencias análogas realizadas a partir de varias zoosporas. En cambio, sustituyendo el porta excavado por una pequeña cámara de vidrio de 20 mm $\times$ 20 mm $\times$ 2 mm de alto, cubierta con vidrio que contenía en su parte interna unas gotas de medio de Detmer conteniendo zoosporas, nos fué posible observar la reproducción del alga. A esta cámara perfectamente esterilizada y cerrada herméticamente, la observamos durante 10-12 días. Después de los 2 días de efectuada la siembra, constatamos en forma neta el crecimiento de las zoosporas, su pérdida de movilidad y posteriormente la división del protoplasma en 2, 4, 8, 16, etc., células.

Conviene hacer notar que las células así formadas, no se separan sino que quedan envueltas por una misma membrana general, por lo que se la denomina célula madre o zoosporangio. A la primera división en 2 le siguen otras, llegándose a contar al final 32 y excepcionalmente 64 zoosporas. En su completo desarrollo la célula madre posee la forma que se observa en la lám. III. Pocos días después de haber llegado a este estado, las zoosporas comenzaron a agitarse en el interior, primero con lentitud, después violentamente.

En un momento dado observamos la ruptura de la membranas de la célula madre, abriéndose un orificio, por donde salieron la zoosporas. Fuera de ella, permanecieron reunidas en algunos casos, y en otros, se dispersaron por la gota de agua, pero en movimiento constante durante más de dos días. Sucedió un período de descanso, en el cual algunas de las células que permanecieron unidas, adoptaron formas geométricas, ligeramente poligonales, por la presión que ejercen las unas sobre las otras y perdieron sus flagelos. En los medios sólidos es más fácil observar esta deformación de las células. Al seguir su crecimiento notamos que unas zoosporas se redondeaban (células vegetativas) y otras comenzaban a dividirse en 2, 4, etc., transformándose en células madres (lám. III). Las causas del distinto comportamiento en porta excavado y en cámaras de tamaño más grande, no han sido en realidad comprobadas. En el primer caso no hubo ruptura de la membrana de la célula madre con salida de zoosporas, lo que a nuestro juicio se hallaría relacionado con la cantidad de medio de cultivo, que por ser mayor en el segundo caso, permanecería prácticamente constante, durante el período de crecimiento de *Chlorococcum infusionum*, en cambio en la gota pendiente del primer caso, la evaporación del agua concentra el medio de tal modo que lo haría prácticamente inapropiado.

Para contar las zoosporas que hay en una célula madre, es conveniente hacerlo en medio sólido — en el cual la movilidad queda reducida al mínimo — y con la ayuda de un ocular reticulado. Para ese fin elegimos una caja de Petri en la que había una célula madre madura, que mostraba en su interior cierta movilidad de las zoosporas. La iluminación del microscopio, resultó ser estímulo suficiente, para provocar una creciente actividad de aquéllas y la ruptura de la membrana de la célula madre o zoosporangio no tardó en producirse. Fuera de la misma, las zoosporas en los medios sólidos tienen poca movilidad, de modo que la dispersión que se produce es muy limitada. Por esta causa y con el auxilio del ocular reticulado, nos resultó relativamente fácil contarlas.

Descripción de las zoosporas. — Miden más o menos 10 μ largo $\times$ 5 μ ancho. Son de forma aovada con una extremidad más aguda, donde se implantan dos flagelos de longitud igual a la

del cuerpo. Al batir uno de los flagelos a ambos lados, se desplazan en zig-zag, mientras que el otro proyectado hacia atrás, se recuesta sobre uno de los bordes del cuerpo. Inmediatamente debajo de la membrana, en la zona donde se implantan los flagelos, se observa, cuando las condiciones son favorables, la mancha ocular de color rojo semejante al estigma de *Euglena*. El cromatóforo está colocado periféricamente, es único y deja hacia el centro de la célula un espacio claro por donde se ve el pirenoide, de forma circular y refringente.

Células madres o zoosporangios. — El diámetro varía entre 18 y 28 μ . Son de forma esférica y contienen zoosporas en número variable, 8, 16, 32 y excepcionalmente 64, según el tamaño de la misma. Alcanzada la madurez se abre un orificio por donde se liberan las zoosporas.

Células vegetativas. — Se producen frecuentemente y tienen unos 15 μ largo $\times$ 12-13 μ ancho, subesféricas, que por compresión mutua se vuelven poligonales. El cromatóforo es de color verde más o menos intenso, según sea la edad de la célula y deja una abertura por la que se puede ver en general un solo pirenoide, o muy raramente dos. La observación de éste, muchas veces no puede realizarse, al quedar enmascarado por las granulaciones que presentan siempre las células viejas.

Igual que Bold (1930) no observamos reproducción sexual con fusión de gametas.

IV. COMPORTAMIENTO DEL C. INFUSIONUM FRENTE A OTRAS FUENTES NUTRITIVAS

Con el objeto de investigar la influencia que sobre el desarrollo de *Chlorococcum infusionum* pudieran tener el C y el N usamos distintas fuentes de carbono y nitrógeno que añadimos al medio de Detmer. Con el mismo fin probamos también la influencia del ión Vanadio que se encuentra con frecuencia en las aguas de nuestro país.

1. *Influencia del carbono.* — Dos fuentes distintas de carbono utilizamos en estas experiencias. Una de ellas consistió en

conseguir una atmósfera con elevada proporción de CO_2 gaseoso, en comparación con la del testigo, que sólo poseía la cantidad normal de la atmósfera; y la otra, carbono al estado de combinación orgánica (glucosa). En el primer caso tratamos de verificar si el aumento del CO_2 en el aire intensificaba la acción clorofílica de esta especie y en el segundo estudiar la influencia que sobre su crecimiento podría tener este azúcar.

Obtención de atmósfera con elevada tensión de CO_2 . — Para estos ensayos recurrimos a una variante del método de Spray (según J. J. Monteverde)¹ para cultivos en anaerobiosis. Los detalles del método son los siguientes. Consiste en dos cajas de Petri de diferente diámetro, una de 10 cm y la otra de 5 cm. La caja menor se usa en la posición normal, fijada por su base con parafina, en la cara interna de la tapa de la cápsula mayor, que debe quedar invertida. La figura 1 aclara la descripción.

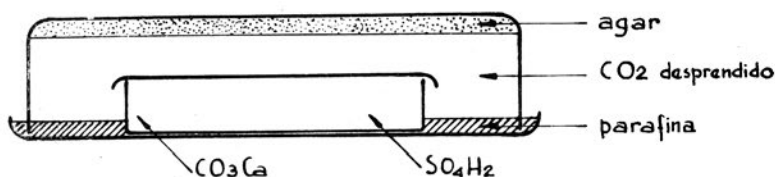


Figura 1

En la cápsula menor se coloca, CO_3Ca y SO_4H_2 de modo que no se mezclen, para lo cual se inclina un poco la misma. Mientras tanto en la caja de la cápsula mayor se pone el medio nutritivo, en este caso Detmer agar 2 % fundido, que una vez solidificado se coloca invertido sobre la mesa, previamente flameada. Se vuelca parafina fundida en el espacio comprendido entre la cápsula menor y las paredes de la tapa de la cápsula mayor. Hecho esto se siembra el alga inmediatamente en la caja de Petri, que invertida, se sumerge en la que posee parafina, cuando esta última esté a punto de solidificarse. Se esperan unos minutos hasta que la parafina se solidifique bien, obteniéndose de esta manera un cierre perfecto. Entonces se mezclan el ácido y

¹ Comunicación verbal.

la sal con una pequeña inclinación de la caja, produciéndose instantáneamente un abundante desprendimiento de CO_2 que ocupa el espacio de ambas. Como depósito queda SO_4Ca y agua en el interior de la caja menor. La cantidad de reactivos no debe ser excesiva, pues de lo contrario el volumen del CO_2 desprendido ejerce una presión elevada. Simultáneamente, y en medios de cultivo de la misma composición, sembramos otra caja de Petri como testigo, a partir de la misma suspensión del alga, que incubamos luego como la anterior. Llevamos inmediatamente las mismas a la vitrina colocada frente a la ventana y después de dos días pudimos comprobar en la caja con CO_2 el desarrollo del alga, que se caracterizaba por la aparición de un suave color verde que cubría la superficie del medio. En los días siguientes este color se fué haciendo más intenso y al cabo de una semana pudimos individualizar a simple vista unos puntos redondeados que constituían los agregados celulares. En el testigo la aparición se produjo a los 5 ó 6 días, en cambio la formación de dichos agregados la comprobamos varios días después. Dados los resultados obtenidos repetimos esta experiencia, llegando en todos los ensayos al mismo resultado, es decir, que el aumento de tensión de CO_2 en la atmósfera exaltaba la actividad de *C. infusionum*, al punto que reducía aproximadamente a la mitad el tiempo de desarrollo. De haber utilizado fuentes luminosas artificiales durante todo el proceso, probablemente se podría haber reducido aún más dicho tiempo. En cuanto al CO_2 la conclusión es válida solamente para los cultivos que se exponen a la acción de la luz del día. Experiencias análogas, pero manteniendo los cultivos en la obscuridad, no produjeron desarrollo alguno, lo que indica que la fijación del CO_2 se realiza únicamente mediante el proceso clorofílico. Este proceso no es general, pues Dangeard (1921) cultivó *Scenedesmus acutus*, en obscuridad durante 8 años y observó que sus algas permanecieron verdes a pesar de la falta de luz, notando solamente un cambio en la morfología, debido al medio sólido y a la falta del factor luminoso. De cualquier modo, estos cambios de forma no se fijaron en la especie, que puesta en condiciones naturales volvió a la primitiva. El medio nutritivo que utilizó fué el de Chodat y Grintzesco (1900), que es muy parecido al de Detmer,

pero contiene además glucosa y peptona. En nuestra experiencia al C de la glucosa lo reemplazamos por CO_2 y a la cajas de Petri puestas en la obscuridad, las controlamos periódicamente con el microscopio y pudimos observar que a los pocos días, los granos de clorofila tendían a perder su forma, haciéndose sus contornos difusos, hasta la desaparición total, poco tiempo después (cuadro n° 1).

Influencia del C al estado de glucosa. — Como complemento a las experiencias anteriores, realizamos algunos ensayos tendien-

CUADRO N° 2

Influencia de la glucosa en el desarrollo del «*Chlorococcum infusionum*»
(Luz difusa)

Experiencias	Medio de cultivo	Tiempo de desarrollo en días						
		4	8	12	16	20	24	28
A	Detmer (testigo)	—	—	—	±	±	±	+
	Detmer y glucosa	—	±	+	+	+	++	++
		—	±	+	+	++	++	++
B	Detmer (testigo)	—	—	±	+	+	+	+
	Detmer y glucosa	—	—	+	+	++	++	++
		—	±	+	+	++	++	++
C	Detmer (testigo)	—	—	—	±	+	+	+
	Detmer y glucosa	—	—	+	++	++	+++	+++
		—	±	+	+	++	+++	+++

tes a determinar, la influencia que sobre el desarrollo de *Chlorococcum infusionum* pudiera tener la glucosa. Las operaciones se efectuaron de igual modo que las anteriores, agregando al medio de Detmer 0,27 g % de glucosa, y en dos oportunidades diferentes, por lo cual los resultados obtenidos se consignan en los cuadros números 2 y 3; que indican en forma evidente la influencia altamente estimulante que sobre el desarrollo de *Chlorococcum infusionum* tiene la glucosa en solución.

CUADRO N° 3

Influencia de la glucosa en el desarrollo del «*Chlorococcum infusionum*»
(Luz difusa)

Experiencias	Medio de cultivo	Tiempo de desarrollo en días						
		4	8	12	16	20	24	28
A	Detmer (testigo)	—	—	—	±	+	+	+
		—	—	—	—	—	—	—
	Detmer y glucosa	—	+	+	+	++	+++	+++
		—	+	+	++	++	+++	+++
		—	+	+	++	++	+++	+++
		—	+	+	++	++	+++	+++
B	Detmer (testigo)	—	—	—	±	+	+	+
		—	—	—	—	—	—	—
	Detmer y glucosa	—	±	+	+	++	++	+++
		—	+	+	+	+	++	++
		—	±	+	+	++	++	+++
		—	±	+	+	++	++	+++

Simultáneamente a estos cultivos expuestos a la luz, ensayamos igual número de tubos a la obscuridad obteniendo siempre resultados negativos.

2. *Influencia de diversas fuentes nitrogenadas. Ensayos con N inorgánico.* — En las experiencias anteriores los distintos medios de cultivo utilizados para el desarrollo de *Chlorococcum infusionum* contenían el N al estado de combinación inorgánica, ya sea como ión NO_3^- o ión NH_4^+ . Con el objeto de averiguar las posibles influencias que sobre su crecimiento pueden tener determinadas combinaciones nitrogenadas, ensayamos varias sales de amonio: cloruro, sulfato y fosfato que sustituyeron al $(\text{NO}_3)_2 \text{Ca}$ del medio de Detmer en proporción equimolecular. Además, agregamos el ión Ca^{++} para compensar la pérdida que se producía al sustituir el $(\text{NO}_3)_2 \text{Ca}$ por las fuentes nitrogenadas ya mencionadas y su proporción se estableció con Cl_2Ca , llevando el pH a 7,0. Todas estas experiencias las realizamos simultáneamente en tubos de ensayo con 8 ml de medio de cultivo, sembrados con la misma cantidad de *Chlorococcum infusionum* y exponiéndolos a la luz solar difusa, durante 30 días.

CUADRO N° 4

Acción del ion NH_4 sobre el desarrollo de « *Chlorococcum infusionum* »

Experiencias	Medio de cultivo	Tiempo de desarrollo en días						
		4	8	12	16	20	24	28
A	Detmer (testigo)	—	—	—	±	±	+	+
		—	—	—	±	±	+	+
		—	—	—	±	±	+	+
	Detmer + $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$	—	—	—	±	±	+	+
B	Detmer + $\text{PO}_4\text{H}(\text{NH}_4)_2$	—	—	—	—	±	±	+
		—	—	—	—	—	—	±
		—	—	—	—	—	±	+
C	Detmer + Cl NH_4	—	—	—	—	±	±	+
		—	—	—	—	—	—	+
		—	—	—	—	±	±	±

El desarrollo se observó a simple vista y también al microscopio, con intervalos regulares, cada cuatro días. Los resultados obtenidos en diferentes oportunidades los detallamos en los cuadros n^{os} 4 y 5, donde puede observarse que el anión incorporado con el radical amonio, carece de acción estimulante o retardatriz.

CUADRO N^o 5

Acción del ion NH_4^+ sobre el desarrollo de « *Chlorococcum infusionum* »

Experiencias	Medio de cultivo	Tiempo de desarrollo en días						
		4	8	12	16	20	24	28
A	Detmer (testigo)	—	+	+	±	+	+	+
		—	—	—	±	+	+	+
		—	—	—	—	±	+	+
	Detmer + $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$	—	—	—	±	+	+	+
		—	—	—	—	±	±	+
		—	—	—	—	—	±	+
B	Detmer + $\text{PO}_4\text{H}(\text{NH}_4)_2$	—	—	—	—	—	±	+
		—	—	—	—	—	—	±
		—	—	—	—	±	±	+
C	Detmer + Cl NH_4	—	—	—	—	±	+	+
		—	—	—	—	—	—	±
		—	—	—	—	—	±	±

Los ensayos a la obscuridad dieron siempre resultados negativos.

Ensayos con nitrógeno orgánico. — Con propósitos similares a los anteriores ensayamos algunos aminoácidos como fuente nitrogenada. Para esto sustituimos en el medio de Detmer su fuente nitrogenada por una cantidad de aminoácidos proporcional (en N) a la sal de calcio que contiene ordinariamente. Aquí, como en el caso anterior el Ca^{++} se integró con Cl_2Ca y los ensayos los realizamos en la misma forma que los anteriores y llevando el pH a 7,0.

Consignamos los resultados en los cuadros siguientes.

CUADRO N° 6

Acción de ciertas sustancias orgánicas nitrogenadas
sobre el desarrollo de «*Chlorococcum infusionum*»

(Luz difusa)

Experiencias	Medio de cultivo	Tiempo de desarrollo en días						
		4	8	12	16	20	24	28
A	Detmer (testigo)	—	—	—	±	+	+	+
		—	—	—	±	±	±	+
		—	—	—	±	±	+	+
	Detmer + asparagina	—	—	±	+	++	++	+++
		—	—	—	+	++	++	+++
		—	—	±	+	++	++	+++
B	Detmer + biuret	—	—	—	+	+	+	+
		—	—	—	+	+	+	+
		—	—	—	+	+	+	+
C	Detmer + glicil-glicina	—	±	±	+	++	++	+++
		—	±	±	+	++	++	++
		—	±	+	+	++	++	++
D	Detmer + leucina	—	—	—	—	±	±	+
		—	—	—	—	±	±	+
		—	—	—	—	±	±	+

CUADRO N° 7

**Acción de ciertas sustancias orgánicas nitrogenadas
sobre el desarrollo de « Chlorococcum infusionum »**

(Luz difusa)

Experiencias	Medio de cultivo	Tiempo de desarrollo en días						
		4	8	12	16	20	24	28
A	Detmer (testigo)	—	—	±	±	±	±	+
		—	—	±	±	±	±	+
		—	—	±	±	±	±	+
	Detmer + asparagina	—	—	±	±	±	±	+
		—	—	±	±	±	±	+
		—	—	±	±	±	±	+
B	Detmer + biuret	—	—	±	±	+	+	++
		—	—	±	±	±	±	+
		—	—	±	±	+	+	++
C	Detmer + glicil-glicina	—	—	±	±	+	+	++
		—	—	±	±	+	++	++
		—	—	±	±	+	++	++
D	Detmer + leucina	—	—	±	±	+	+	+
		—	—	±	±	+	+	++
		—	—	±	±	+	+	+

CUADRO N° 8

Acción de ciertas sustancias orgánicas nitrogenadas
sobre el desarrollo de « *Chlorococcum infusionum* »

(Luz difusa)

Experiencias	Medio de cultivo	Tiempo de desarrollo en días						
		4	8	12	16	20	24	28
A	Detmer (testigo)	—	—	—	±	±	+	+
		—	—	—	±	±	+	+
		—	—	—	±	±	+	+
	Detmer + asparagina	—	—	—	±	±	+	+
		—	—	—	±	±	+	+
		—	—	±	±	±	+	+
B	Detmer + biuret	—	—	—	±	±	+	+
		—	—	—	±	±	+	+
		—	—	—	±	±	+	+
C	Detmer + glicil-glicina	—	—	±	±	+	+	++
		—	—	±	±	±	+	+
		—	—	±	±	+	+	++
D	Detmer + leucina	—	—	—	±	±	+	+
		—	—	—	±	±	+	+
		—	—	—	±	±	+	+

De estos resultados se deduce que los aminoácidos tienen un comportamiento variable en su desarrollo. Algunos, como la asparagina y la leucina, se comportan en forma análoga a las sales de amonio. En consecuencia no se observan diferencias apreciables de desarrollo con el testigo. En cambio el dipéptido glicil-glicina parece acelerar la multiplicación de *Chlorococcum infusionum*. En cuanto al biuret, su comportamiento es similar al de los aminoácidos citados anteriormente.

Experiencias con el ion V (Metavanadato de sodio)

Experiencias	Medio de cultivo	Condiciones de la experiencia	Tiempo de desarrollo en días							
			10	15	20	25	30	40	50	
A	Detmer + 0,01 mg % $\text{VO}_3 \text{Na}$	Luz difusa	± ± ± - - -	± ± ± - - -	± ± ± - - -	± ± ± - - -	+++ - - -	+++ - - -	+++ - - -	+++ - - -
		Obscuridad	± ± ± - - -	± ± ± - - -	± ± ± - - -	+++ - - -	+++ - - -	+++ - - -	+++ - - -	+++ - - -
B	Detmer + 0,05 mg % $\text{VO}_3 \text{Na}$	Luz difusa	± ± ± - - -	± ± ± - - -	+++ - - -	+++ - - -	+++ - - -	+++ - - -	+++ - - -	+++ - - -
		Obscuridad	± ± ± - - -	± ± ± - - -	+++ - - -	+++ - - -	+++ - - -	+++ - - -	+++ - - -	+++ - - -
C	Detmer + 0,1 mg % $\text{VO}_3 \text{Na}$	Luz difusa	± ± ± - - -	+++ - - -	+++ - - -	+++ - - -	+++ - - -	+++ - - -	+++ - - -	+++ - - -
		Obscuridad	± ± ± - - -	+++ - - -	+++ - - -	+++ - - -	+++ - - -	+++ - - -	+++ - - -	+++ - - -
D	Detmer + 0,25 mg % $\text{VO}_3 \text{Na}$	Luz difusa	± ± ± - - -	± ± ± - - -	+++ - - -	+++ - - -	+++ - - -	+++ - - -	+++ - - -	+++ - - -
		Obscuridad	± ± ± - - -	± ± ± - - -	+++ - - -	+++ - - -	+++ - - -	+++ - - -	+++ - - -	+++ - - -
E	Detmer + 0,50 mg % $\text{VO}_3 \text{Na}$	Luz difusa	+++ - - -	+++ - - -	+++ - - -	+++ - - -	+++ - - -	+++ - - -	+++ - - -	+++ - - -
		Obscuridad	+++ - - -	+++ - - -	+++ - - -	+++ - - -	+++ - - -	+++ - - -	+++ - - -	+++ - - -
F	Detmer + 0,75 mg % $\text{VO}_3 \text{Na}$	Luz difusa	+++ - - -	+++ - - -	+++ - - -	+++ - - -	+++ - - -	+++ - - -	+++ - - -	+++ - - -
		Obscuridad	+++ - - -	+++ - - -	+++ - - -	+++ - - -	+++ - - -	+++ - - -	+++ - - -	+++ - - -
G	Detmer + 1 mg % $\text{VO}_3 \text{Na}$	Luz difusa	+++ - - -	+++ - - -	+++ - - -	+++ - - -	+++ - - -	+++ - - -	+++ - - -	+++ - - -
		Obscuridad	+++ - - -	+++ - - -	+++ - - -	+++ - - -	+++ - - -	+++ - - -	+++ - - -	+++ - - -
H	Detmer + 2 mg % $\text{VO}_3 \text{Na}$	Luz difusa	± ± ± - - -	± ± ± - - -	+++ - - -	+++ - - -	+++ - - -	+++ - - -	+++ - - -	+++ - - -
		Obscuridad	± ± ± - - -	± ± ± - - -	+++ - - -	+++ - - -	+++ - - -	+++ - - -	+++ - - -	+++ - - -
I	Detmer + 5 mg % $\text{VO}_3 \text{Na}$	Luz difusa	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -
		Obscuridad	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -
J	Detmer testigo	Luz difusa	- - - - -	- - - - -	+++ - - -	+++ - - -	+++ - - -	+++ - - -	+++ - - -	+++ - - -
		Obscuridad	- - - - -	- - - - -	+++ - - -	+++ - - -	+++ - - -	+++ - - -	+++ - - -	+++ - - -

Experiencias con el ion V (Metavanadato de sodio)

Experiencias	Medio de cultivo	Condiciones de la experiencia	Tiempo de desarrollo en días						
			10	15	20	25	30	40	50
A	Detmer + 0,01 mg % $\text{VO}_3 \text{Na}$	Luz difusa	— — — — —	± ± ± — —	± ± ± — —	± ± ± — —	++ + — —	++ + — —	++ + — —
		Obscuridad	— — — — —	— — — — —	— — — — —	— — — — —	— — — — —	— — — — —	— — — — —
B	Detmer + 0,05 mg % $\text{VO}_3 \text{Na}$	Luz difusa	— — — — —	± ± ± — —	++ + — —	++ + — —	++ + — —	++ + — —	++ + — —
		Obscuridad	— — — — —	— — — — —	— — — — —	— — — — —	— — — — —	— — — — —	— — — — —
C	Detmer + 0,1 mg % $\text{VO}_3 \text{Na}$	Luz difusa	± ± ± — —	++ + — —	++ + — —	++ + — —	++ + — —	++ + — —	++ + — —
		Obscuridad	— — — — —	— — — — —	— — — — —	— — — — —	— — — — —	— — — — —	— — — — —
D	Detmer + 0,25 mg % $\text{VO}_3 \text{Na}$	Luz difusa	± ± ± — —	++ + — —	++ + — —	++ + — —	++ + — —	++ + — —	++ + — —
		Obscuridad	— — — — —	— — — — —	— — — — —	— — — — —	— — — — —	— — — — —	— — — — —
E	Detmer + 0,50 mg % $\text{VO}_3 \text{Na}$	Luz difusa	± ± ± — —	++ + — —	++ + — —	++ + — —	++ + — —	++ + — —	++ + — —
		Obscuridad	— — — — —	— — — — —	— — — — —	— — — — —	— — — — —	— — — — —	— — — — —
F	Detmer + 0,75 mg % $\text{VO}_3 \text{Na}$	Luz difusa	± ± ± — —	++ + — —	++ + — —	++ + — —	++ + — —	++ + — —	++ + — —
		Obscuridad	— — — — —	— — — — —	— — — — —	— — — — —	— — — — —	— — — — —	— — — — —
G	Detmer + 1 mg % $\text{VO}_3 \text{Na}$	Luz difusa	± ± ± — —	++ + — —	++ + — —	++ + — —	++ + — —	++ + — —	++ + — —
		Obscuridad	— — — — —	— — — — —	— — — — —	— — — — —	— — — — —	— — — — —	— — — — —
H	Detmer + 2 mg % $\text{VO}_3 \text{Na}$	Luz difusa	± ± ± — —	++ + — —	++ + — —	++ + — —	++ + — —	++ + — —	++ + — —
		Obscuridad	— — — — —	— — — — —	— — — — —	— — — — —	— — — — —	— — — — —	— — — — —
I	Detmer + 5 mg % $\text{VO}_3 \text{Na}$	Luz difusa	— — — — —	— — ± — —	± ± ± — —	++ + — —	++ + — —	++ + — —	++ + — —
		Obscuridad	— — — — —	— — — — —	— — — — —	— — — — —	— — — — —	— — — — —	— — — — —
J	Detmer (testigo)	Luz difusa	— — — — —	++ + — —	++ + — —	++ + — —	++ + — —	++ + — —	++ + — —
		Obscuridad	— — — — —	— — — — —	— — — — —	— — — — —	— — — — —	— — — — —	— — — — —

3. *Influencia del vanadio.* — El examen de las muestras de agua provenientes de distintos sitios del país, nos había permitido observar que en ciertos casos, se producía a los pocos días de estar los frascos sobre las mesas del laboratorio, un desarrollo abundante de algunas *Chlorophyceae* que se depositaban en el fondo y las paredes en contacto con el agua. Este fenómeno ocurría en forma más o menos continuada e intensa sólo con aguas provenientes de ciertas regiones del país. Con el objeto de verificar si existía una relación entre el crecimiento de *Chlorophyceae* y la composición química del agua, examinamos con prolijidad los análisis químicos correspondientes, observando como única característica de estas aguas, la presencia de un metal relativamente raro: el vanadio. Estos hechos nos decidieron a determinar la posible influencia que el V podría tener sobre el alga en estudio.

Con el objeto de realizar esta investigación utilizamos una solución de metavanadato de sodio (VO_3Na), que agregado al medio de Detmer ya citado, diera una concentración de V equivalente a las cifras que se indicaban en los análisis mencionados. El pH fué llevado a 7,0 y se esterilizaron los tubos con los medios resultantes en el autoclave a 120°C por espacio de media hora. De cada una de las concentraciones preparadas se sembraron tres tubos conteniendo 5 ml de medio y como siempre, se usó como testigo el medio de Detmer. Los cuadros n^{os} 9 y 10 demuestran las diferencias de desarrollo observadas a simple vista en los diferentes tubos.

La apreciación del desarrollo de las algas resulta fácil cuando esa diferencia es grande, en cambio cuando su crecimiento es semejante como sucede a menudo, se hace necesario afinar la observación. Para esto, es cómodo recurrir al siguiente artificio. De cada cultivo previamente homogeneizado por agitación, se retira rápidamente 1 ml y se deja caer sobre un bizcocho de porcelana o bien sobre un trozo de papel de filtro. En estas condiciones, la intensidad de la mancha verde que resulta una vez absorbida el agua, permite apreciar con mayor precisión, pequeñas diferencias de desarrollo. Este artificio fué usado también para tener un punto de referencia en el crecimiento de todos los demás medios ya mencionados.

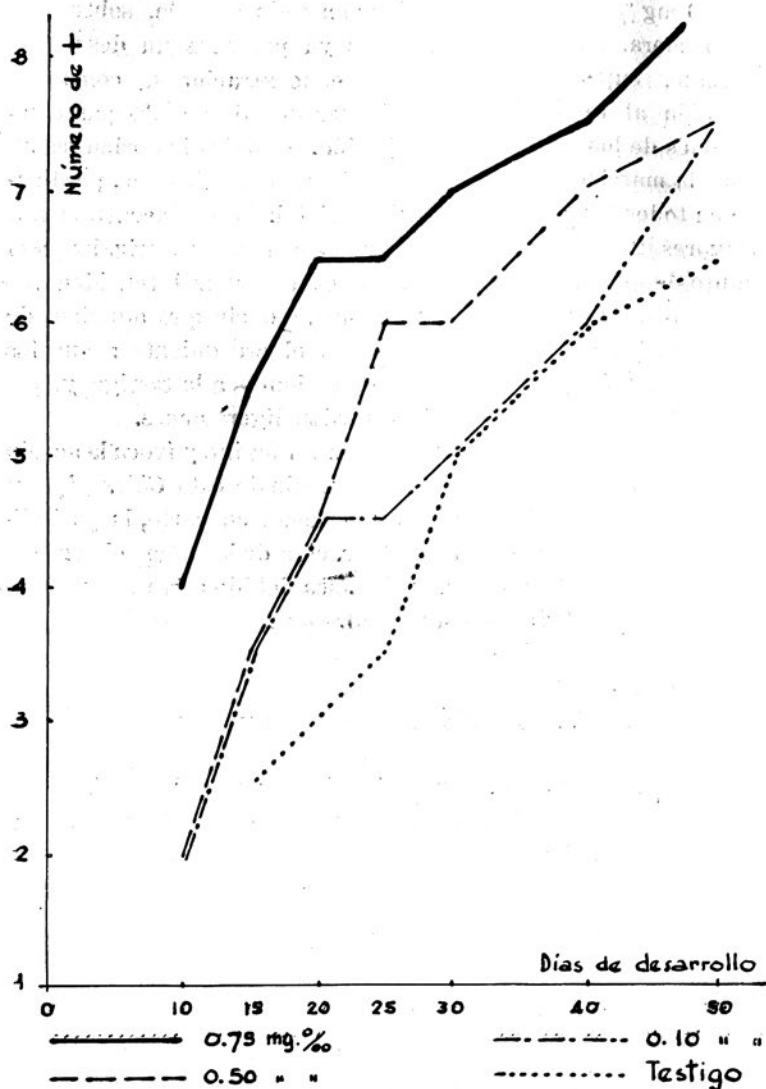


Fig. 2. — Intensidad de desarrollo de *Chlorococcum infusionum* en medio de Detmer conteniendo distintas cantidades de metavanadato de sodio

En la figura 2 se expresan gráficamente los datos obtenidos en aquellas concentraciones que resultaron más beneficiosas para el crecimiento de *Chlorococcum infusionum*. Las de 0,75

y 0,50 mg ‰ son las más activas en todo sentido, sobre todo la primera, porque a los 10 días ya presenta un desarrollo notable, superior a las demás concentraciones, como así también al testigo, el cual alcanza un desarrollo parecido, después de los 25 días de incubación. Pasados los primeros 20 días, la marcha de los cultivos comienza a equilibrarse, perdiendo en todos los casos su impulso inicial. Las concentraciones mayores (2 a 5 mg ‰) ejercen una acción retardatriz, hasta el punto de que en ellas el desarrollo es de menor intensidad que en la testigo. En definitiva se puede decir que aquellas de 0,75 mg ‰ y 0,50 mg ‰ aceleran el crecimiento; que las de 0,25 mg ‰ y 1 mg ‰ son equivalentes a la testigo y que las de 2 mg ‰ a 5 mg ‰ lo retardan ligeramente.

Estas experiencias demuestran en forma inequívoca la acción estimulante que ejercen en el desarrollo de esta *Chlorophyceae* ciertas concentraciones de V, y verifican en parte, la posibilidad de que el fenómeno de proliferación de las algas observado en los frascos arriba mencionados, sea debido a la presencia de pequeñas cantidades de este metal.

V. OTRAS TÉCNICAS EMPLEADAS

En la II parte de este trabajo hicimos mención de la colección de algas y a la fijación y conservación sobre el terreno. Aun cuando este trabajo no se refiere a estas técnicas, nos parece sin embargo oportuno añadir algunas palabras más, a modo de complemento.

Los trabajos que se refieren a la fijación, conservación, etc., abarcan un campo experimental muy grande, y a pesar de los progresos realizados hasta el presente, no se han hallado todavía fijadores, conservadores, etc., que puedan ser aplicados a la mayoría de las algas conocidas en la actualidad. Muchos de los métodos que se conocen son largos y engorrosos, y la técnica que se elija deberá ser realizada con suma meticulosidad, porque sino, no se llega a resultados alentadores (Pfeiffer).

Realizamos gran número de ensayos con líquidos fijadores conocidos, como son los de Flemming (ácido cromo-acético,

ácido crómico-ósminico acético), de Cambridge según Chamberlain (1932), (formol-ácido acético), de Amann (1896) (lactofenol cúprico); formol y alcohol rebajados y vapores de ácido ósmico. En algunos casos, con las fórmulas originales, obtuvimos resultados satisfactorios; sin embargo, para otros géneros fué necesario rebajar las concentraciones a la mitad, y en algunos casos aún más. Los tres primeros resultaron buenos para un número reducido de géneros, en cuanto al lactofenol cúprico de Amann, podemos decir que fué inmejorable para muchas especies de algas. Muchos géneros de *Chlorophyceae*, *Conjugatae*, *Charophyta*, *Bacillariophyta*, *Flagellatae*, *Schyzophyta*, etc., pueden ser fijados con sólo buscar la concentración lactofenolcúprico adecuada, que en todos los casos deberá ser menor del 5 %. Se puede afirmar que con este líquido, en muchos casos son pocas las diferencias morfológicas entre un alga viva y otra fijada. Tanto es así que el citoplasma, núcleo, cloroplastidos, etc., sufren a veces cambios apenas perceptibles.

Conservadores. — Hemos podido constatar que en el lactofenol cúprico pueden conservarse por mucho tiempo las algas que fueron fijadas con él, sobre todo si se tiene la precaución de cambiarles el líquido periódicamente. Otro conservador que da buen resultado es el agua alcanforada, debiendo renovársele también el líquido.

El lactofenol cúprico usado como fijador puede servir también para montar las preparaciones definitivamente. Para realizar esta operación se coloca sobre el porta-objeto una gota más bien pequeña de lactofenol cúprico y luego las algas, disponiéndolas de manera que no formen cúmulos. Esto último es importante, pues entre el porta- y el cubre-objeto que se coloca luego, no debe de haber mucho líquido, de modo que permita bordear el preparado fácilmente.

VI. CONCLUSIONES

Chlorococcum infusionum. — 1) En los medios de cultivo y en las condiciones experimentales usadas se desarrolla siempre en presencia de luz.

2) Una mayor concentración de CO_2 en el aire o la presencia de glucosa en el medio de cultivo, aumentan la velocidad de su desarrollo.

3) En general el ión NO_3^- le resulta más efectivo para el desarrollo que el ión NH_4^+ cuando se incorpora a los medios de cultivo.

4) Su crecimiento parece ser estimulado por la glicil-glicina y VO_3Na .

VII. BIBLIOGRAFÍA

- AMANN, J., *Nouvelles méthodes de preparation des algues cellulaires vertes*. — *Journ. Bot.* **10** (1896) 187-190.
- BEYERINK, M. W., *Kulturversuche mit zoochlorellen, lichenogonidien und niederen algen*. — *Bot. Zeit.* **48** (1890) 725.
- BOLD, H. C., *Life history and cell structure of C. infusionum*. — *Bull. Torrey Bot. Club.* **57** (1930) 577-604. 5 fig.
- BRISTOL, B., MURIEL, M. SC., *On Malay form of C. humicola* (Näg). Rab. — *Journ. Lim. Soc. Bot.* **44** (1919) 473-82. 2 lám. 37 fig.
- CATALDI, M. D., *Aislamiento en cultivo puro de Cianofíceas y algas monocelulares*. — *Darwiniana.* **5** (1941) 228-239. 4 lám.
- CHAMBERLAIN, C. J., *Methods in plant histology*. 1932.
- CHARPENTIER, P. G., *Alimentation azotée d'une algue. Le « Cystococcus humicola »*. — *Ann. Inst. Pasteur.* **17** (1903) 321-334.
- CHARPENTIER, P. G., *Recherches sur la Physiologie d'une algue verte*. — *Ann. Inst. Pasteur.* **17** (1903) 369-420.
- CHODAT, R. et MALINESCO, O., *Sur le polymorfisme du « Scenedesmus acutus »* Mey. — *Bull. Herb. Boiss.* **1** (1893) 184-190.
- CHODAT, R. et GRINTZESCO, J., *Sur les méthodes de culture des algues vertes*. — *Act. 1er. Congr. Intern. Bot. Paris* (1900) 157-162.
- CHODAT, R., *Materiaux pour servir à l'histoire des Protococcoides*. — *Bull. Herb. Boiss.* **2** (1894) 585-616.
- DANGEAR, A. P., *Observations sur une algue cultivée à l'obscurité depuis huit ans*. — *Comp. Rend. Acad. Sc. Paris.* **172** (1921) 254-260.
- FRITSCH, F. E., *The structure and reproduction of the algae*. **1** (1935) 145-47. 1 fig.

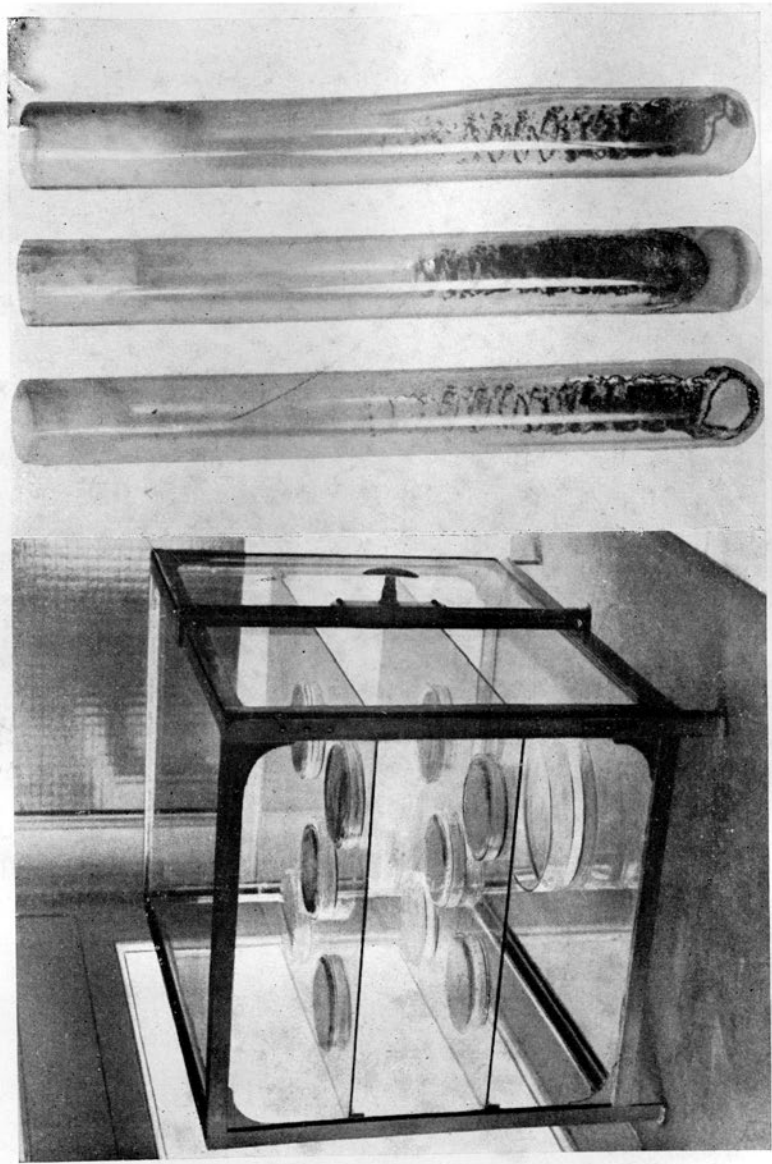
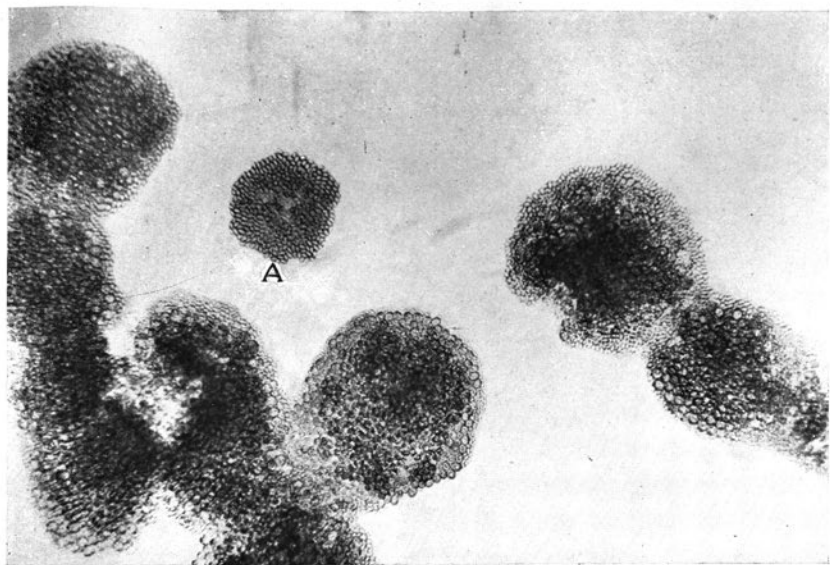
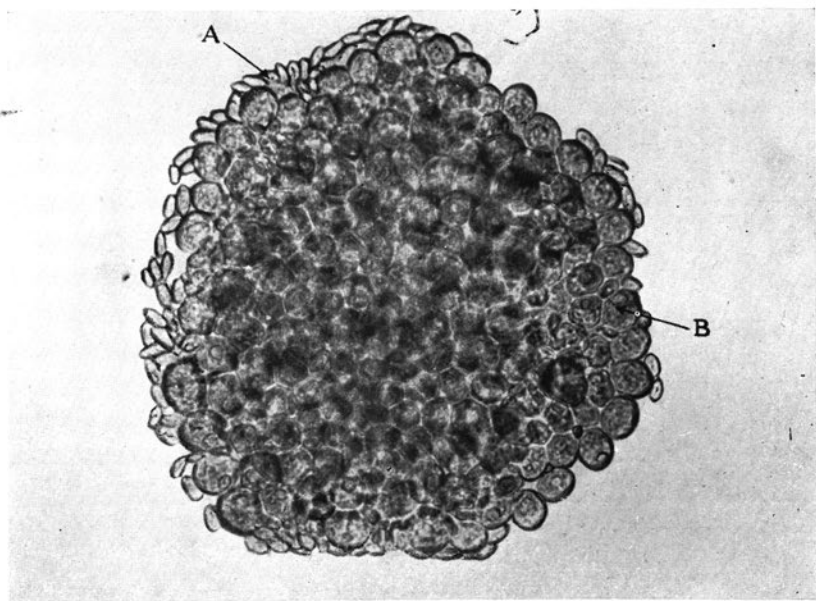


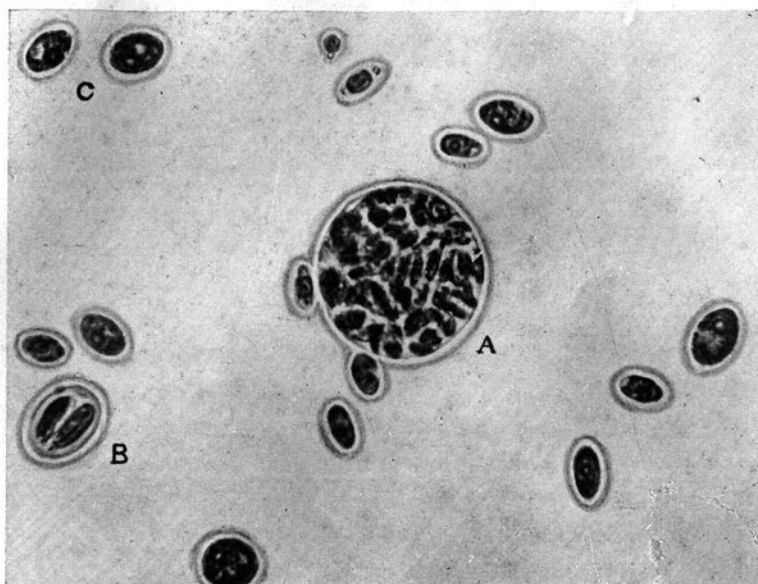
Fig. : Vista de la cámara húmeda (vitrina) en la que pueden distinguirse las cajas de Petri mostrando el desarrollo de *Chlorococcum infusionum*. Der. : Tubos conteniendo medio de Detmer solidificado, para mostrar desarrollo en estrías. (Cultivo de 25 días). $\times 2/3$.



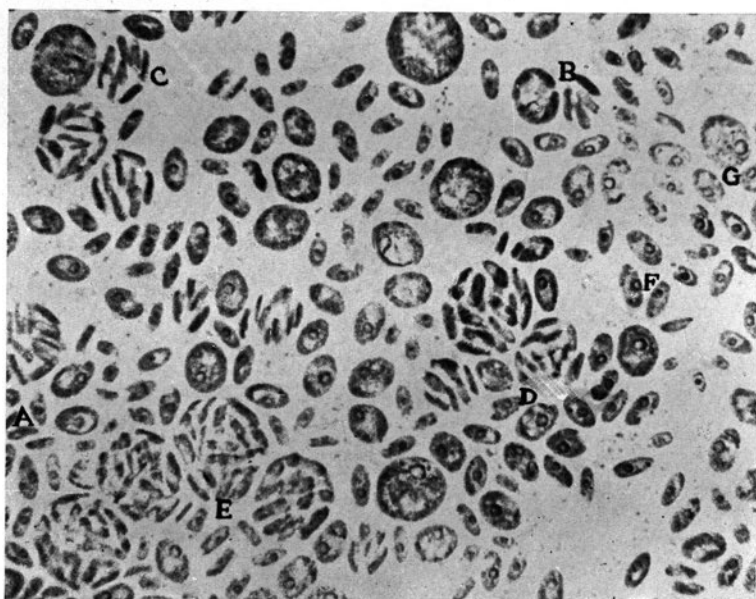
Aspecto parcial de una caja de Petri mostrando varios agregados en diferentes estados de desarrollo y completamente aislados. A, Colonia joven. $\times 60$.



Agregado celular puño de *Chlorococcum infusionum*, en medio sólido. Pueden observarse : A, zoosporas ; B, células poliédricas, debido a la presión mutua. $\times 160$.



A, célula madre momentos antes de la ruptura de su membrana; B, célula conteniendo dos zoosporas; C, zoosporas en período de descanso; se observa el pirenoide. $\times 1400$.



Aspecto de un agregado de *Chlorococcum infusionum* diluido en agua. Células madres conteniendo: A, dos zoosporas; B, 4; C, 8; D y E, un número mayor; F, zoosporas en período de descanso; G, células vegetativas en las que se pueden ver pirenoides. $\times 400$.

- GERNECK, R., *Zur Kenntnis der niederen Chlorophyceae. C. infusionum.* — *Beihefte (zum) Botanis. Centralb.* **21** (1907) 235-240.
- GRINTZESCO, J., *Recherches expérimentales sur la morphologie et la physiologie de Scenedesmus acutus Meyen.* — *Bull. Herb. Boiss.* 2^a sér. **2** (1902) 406-429. 6 figs.
- KUFFERATH, A., *La culture des algues.* — *Revue Algologique.* Paris (1930).
- MIQUEL, P., *De la culture artificielle des diatomées.* — *Le micrographe préparateur.* **5** (1897) 69-76 ; 104-108 ; 159-163 ; 206-211. 2 fig., *ibid.*, **6** (1898) 34-38 ; 83-85 ; 127-133 ; 226-233. 4 fig.
- OLTMANN, FR., *Morphologie und Biologie der Algen.* **1** (1922) 254-58. 1 fig.
- PFEIFFER, F., *Préparation des algues d'eau douce.* *Pringsheim Jahrbücher, Wiss. botanik.* **26**, 4 (Traducción francesa por Chalon, *Bull. Soc. Microscop. Belgique*).
- PRINTZ, H., *Chlorophyceae* en ENGLER, A., *Die Natürlichen Pflanzenfamilien.* **3** (1927) 87-88.
- RADAIS, M., *Sur la culture pure des algues a l'état de pureté.* — *Ac. 1er. Congr. Int. Bot. Paris* (1900) 163-167.
- SCHRAMM, J. R., *Some pure culture methods in the Algae.* — *Missouri Bot. Garden.* **1** (1914) 23-45.
- SORIANO, S., *Dispositivo sencillo para micromanipulaciones.* — *Folia Biol.* (1935) 47, 48, pg. 205-210.
- SPRAY, S., *An improved anaerobic culture dish.* — *J. L. a C. M.* ; **16** (1930) 203. (Según WEINBERG, NATIVELLE Y PRÉVOT, *Les microbes anaérobies* (1937).
- SMITH, G. M., *The fresh-water algae of U. S.* (1933) 466-68. 1 fig.
- VISCHER, W., *Etudes d'algologie expérimentale.* — *Extrait du Bull. Soc. Bot. Genève.* **18** Serv. 2 ; fasc. 2 (1926) 184-245.
- WEST, G. S. and FRITSCH, F. E., *A treatise on the British freshwater algae.* Cambridge (1932) 105-107.

Dirección de Laboratorios. Administración Nacional del Agua.