

# EL EMPLEO DE LOS COLORANTES PARA EL ESTUDIO CITOLOGICO DE LAS DIATOMEAS

Por el Dr. HUGO J. FERRANDO <sup>1</sup>

## INTRODUCCION

El conocimiento de las Diatomeas, implica, para el total estudio de las mismas, la utilización de técnicas adecuadas para la mejor visualización de sus elementos constituyentes.

En un principio, las Diatomeas fueron estudiadas con un sentido casi exclusivamente taxonómico, con vistas a la clasificación de las diferentes especies halladas en las muestras recolectadas. Como los caracteres diferenciales se hallan principalmente radicados en las diferentes ornamentaciones de las estructuras silíceas que constituyen el frústulo, las técnicas estuvieron orientadas para una mejor visión del mismo, procurando la destrucción de toda sustancia, en especial orgánica (citoplasma, núcleo, cromatóforos, etc.), que obstaculizan dicha visión.

En este sentido es que se utilizan las técnicas de destrucción de materia orgánica, mediante la acción de ácidos fuertes, permanganato de potasio, peróxido de hidrógeno, etc..

No obstante, sin dejar de reconocer la importancia primaria del estudio taxonómico, vemos que cuando entramos a estudiar las Diatomeas desde un punto de vista citológico, se nos hace necesario conocer más íntimamente el contenido orgánico de esos frústulos, pues notamos en su interior, variaciones, que lógicamente son derivadas de los cambios en los factores ambientales.

En los últimos años, algunos investigadores han iniciado este estudio citológico de las Diatomeas. Unos, mediante el uso de

---

1) Ayudante Técnico (Suplente) del Departamento de Investigaciones Pesqueras y Biología Marina, del Instituto de Industria Animal.

colorantes, y otros, por medio de los cultivos de estos microorganismos planctónicos marinos.

En nuestro caso, hemos encarado una etapa inicial, que consiste en el uso de colorantes de utilización corriente en las técnicas histológicas, introduciendo las modificaciones que consideramos oportunas para su aplicación en este tipo de materiales. El fin de esta primera etapa, es el de estudiar la citología de las Diatomeas "post-mortem", para el conocimiento de sus organizaciones estructurales internas. Para ello, hemos trabajado con material fijado. Posteriormente, entraremos al estudio del funcionamiento de esas estructuras, para lo cual será necesario el empleo de los cultivos en medios apropiados y las coloraciones "in vivo" de estos vegetales marinos (dichos trabajos los tenemos en la etapa inicial).

#### **Material empleado.**

Se ha elegido para este estudio, materiales del fitoplancton costero de la localidad de Atlántida (Uruguay), cuya situación geográfica aproximada es la siguiente: Río de la Plata, 34°47' Lat. S, 55°46' Long. W..

Su recolección se ha realizado mediante redes de mano, cuya parte filtrante fué construída en "dacron". Las pescas se han llevado a cabo durante las cuatro estaciones del año, a los efectos de trabajar con muestras de diferentes características, es decir, de diversas calidades de aguas y con la mayor variedad de especies.

Así mismo se ha utilizado fitoplancton de largo tiempo atrás, en lo que se refiere a la fecha de recolección, para de ese modo comprobar la influencia de este factor en los resultados de la tinción posterior, tal es el caso de una muestra que se obtuvo el 21 de diciembre de 1945, cuyo contenido en *Biddulphia sinensis* Greville fué excepcional.

#### **Fijadores y colorantes utilizados.**

El fijador empleado en los materiales fué el formol\* de uso corriente en la técnica histológica. Para algunos casos especiales, como en el método con el May-Grünwald-Giemsa, se usó la mezcla débil de Flemming cuya fórmula es la siguiente:

---

\* Formol o formalina: solución acuosa al 36-40% de formaldehído gaseoso.

## ANALES DE LA FACULTAD DE VETERINARIA

|                           |         |
|---------------------------|---------|
| Acido crómico al 1% ..... | 25 c.c. |
| Acido ósmico al 2% .....  | 5 c.c.  |
| Acido acético al 1% ..... | 10 c.c. |
| Agua destilada .....      | 60 c.c. |

En las pruebas preliminares se usaron los siguientes colorantes o combinaciones de los mismos:

Hematoxilina férrica de Heidenhain.  
Hemalumbre de Carazzi (Glicerohemalumbre).  
Eosina (Solución acuosa al 1%).  
Hemalumbre-Eosina.  
Laca férrica-Eosina.  
May-Grünwald.  
Giemsa.  
May-Grünwald Giemsa.

### Método.

Dado la presentación del material a estudio, se utilizó un método de tinción por dilución en masa. Para ello se empleó el tubo clásico de centrífuga de 15 c.c. de capacidad.

Se procedió, en términos generales, de la siguiente manera:

- 1) Dilución del material en agua destilada\*.
- 2) Agregado del colorante.
- 3) Tiempo de coloración (agitando a intervalos regulares).
- 4) Agregado de agua destilada (detención del tiempo de coloración).
- 5) Centrifugado (2500 R/Min. durante 5 minutos).
- 6) Escurrido del sobrenadante.
- 7) Agregado de 10 c.c. de agua destilada y nuevo centrifugado.
- 8) Repetición del tiempo (7) unas 4 ó 5 veces (lavado).
- 9) Escurrido del sobrenadante y pasaje a tubo para conservación posterior.
- 10) Agregado de formol (preservación).

---

\* Se usan pipetas tipo Pasteur, de uso corriente en Bacteriología.

**RESULTADOS SEGUN LOS COLORANTES EMPLEADOS**

**Hematoxilina férrica de Heidenhain.**

Se utilizó la siguiente dilución:

XX gotas de material.

L " " agua destilada.

L " " alumbre de hierro al 3% (mordiente).

Tiempo de mordentado: 24 horas.

L gotas de Hematoxilina (previamente filtrada).

Tiempo de coloración: 30 minutos.

Suele suceder que se produzca gran cantidad de precipitados, los cuales se eliminan con el agregado de L gotas de Alumbre de hierro al 3%, durante 10 minutos.

**Resultado.** En los *Coscinodiscus* se aprecia la membrana bien definida; los cromatóforos se comportan como corpúsculos basófilos picnóticos; el núcleo uniformemente coloreado, deja un claro bien evidente, correspondiente al nucleolo. La esculturación del frústulo es apreciable.

En *Biddulphia sinensis* Grev., además de las mismas características tintoriales anotadas para los *Coscinodiscus*, hemos localizado en una muestra del 5|VIII|55 y coloreada el 17|VIII|56 (1 año de fijada en formol), unas formaciones en el citoplasma con las siguientes características: cuerpo esférico en cuyo interior se nota un contenido de aspecto filamentoso, dispuesto en ovillo compacto, un tanto retraído de la membrana limitante; además, de ese cuerpo esférico emergen dos filamentos que rematan en sus extremos distales, por terminaciones globosas. Toda esta estructura ha tomado en mayor o en menor grado el colorante, lo que indica su naturaleza basófila. De acuerdo a la descripción efectuada (Fig. N° 1) y en base a los trabajos de Bergon en el proceso de esporulación de *Biddulphia mobiliensis*, de Gran en *Rhizosolenia styliformis* y de Karsten en *Corethron valdiviae*, consideramos estar en presencia de un proceso de micro-esporulación en *Biddulphia sinensis* Grev.

**Glicerohemalumbre de Carazzi (Coloración progresiva).**

Fórmula: Disolver, sin calentar.

|                           |     |      |
|---------------------------|-----|------|
| Agua destilada            | 400 | c.c. |
| Glicerina                 | 100 | c.c. |
| Alumbre de potasio        | 25  | g.   |
| Yodato de potasio         | 0   | g.1  |
| Hematoxilina cristalizada | 0   | g.5  |

Dilución empleada:

XX gotas de material.  
XL " " agua destilada.  
XXX " " Carazzi (filtrado).

Tiempo de coloración: 20 minutos.

5 c.c. de agua corriente o con agua alcalinizada (virado).

Centrifugado: 2500 Rev. | Min. durante 5 minutos.

Seguir como se indica en la pág. 21, desde el tiempo 6 en adelante.

**Resultado.** Buena tinción nuclear, aunque tomó algo el citoplasma, posiblemente por exceso en el tiempo de actuación del colorante.

**Solución acuosa de eosina al 1%** (Coloración regresiva).

Dilución empleada:

XX gotas de material.  
XL " " agua destilada.  
XXX " " Eosina al 1%.

Tiempo de coloración: 20 minutos.

5 c.c. de alcohol 70° (regresión).

Centrifugado: 2500 Rev. | Min. durante 5 minutos.

Seguir como se indica en la pág. 21, desde el tiempo 6 en adelante.

**Resultado.** Escasa tinción citoplasmática, no dando un contraste adecuado.

**Hemalumbre-Eosina.**

Dilución empleada:

XX gotas de material.  
XL " " agua destilada.  
XXX " " Hemalumbre de Carazzi.

Tiempo de coloración: 20 minutos.

5 c.c. de agua corriente (virado).

Centrifugado: 2500 Rev. | Min. durante 5 minutos.

Ecurrir sobrenadante y agregar 5 c.c. de agua destilada.

Centrifugado: 2500 Rev. | Min. durante 5 minutos.

- Escurrir y agregar 2 c.c. de agua destilada.  
XXX gotas de Eosina al 1%.  
Tiempo de coloración: 20 minutos.  
2 c.c. de alcohol 70° (regresión o diferenciación).  
Centrifugado y seguir el método general de lavado.

**Resultado.** Este método produce un buen contraste entre las distintas estructuras, resaltando en especial la tinción nuclear, de aspecto paquicromático de naturaleza basófila y apreciándose nítidamente el nucléolo, el que muestra una acidofilia marcada. El citoplasma toma de un modo homogéneo un tinte rosado. Los géneros observados han sido: *Coscinodiscus*, *Biddulphia*, *Ditylum*, *Pleurosigma*, *Bacteriastrium*, *Nitzschia*, etc..

#### **Laca férrica-Eosina.**

Dilución empleada:

XXX gotas de material.  
XL " " agua destilada.  
XXX " " laca férrica\* (previamente filtrada).

Tiempo de coloración: 30 minutos.

\*Laca férrica: 10 c.c. de Hematoxilina (Sol. acuosa al 1%).  
10 c.c. de Alumbre de hierro al 3%.  
Se prepara 24 horas antes de la tinción.

Lavados y centrifugaciones repetidas.

XX gotas de Eosina (Sol. acuosa al 1%).

Tiempo de coloración: 20 minutos.

5 c.c. de alcohol 70°.

Lavados y centrifugaciones repetidas.

**Resultado.** En lo que respecta a la laca férrica, produce aceptable tinción de los elementos nucleares, pero la eosina es un colorante que a pesar de todos los buenos resultados que proporciona en la técnica histológica clásica, en este caso particular de las Diatomeas y asociado con una laca férrica, no rinde los resultados esperados. No sucede lo mismo en la combinación con la mezcla de Carazzi, en que no se produce la decoloración tan manifiesta como en este caso.

#### **May-Grünwald Giemsa.**

Con respecto a este método de tinción, por ser el que nos ha dado mejores resultados, tanto por separado como en con-

junto (tipo panóptico), vamos a describirlo en la totalidad de los tiempos del método combinado, por cuanto de esa descripción se deducirán los procedimientos simples.

Dilución empleada:

XX gotas de material.  
XL " " agua destilada.  
XXX " " May-Grünwald.

Tiempo de coloración: 20 minutos.

5 c.c. de agua destilada.

Centrifugado: 2500 Rev. Min. durante 5 minutos.

Escurrir el sobrenadante y agregar 10 c.c. de agua destilada.

Repetir esta operación de lavado y centrifugado unas 2 ó 3 veces, dependiendo del grado de transparencia del sobrenadante.

Una vez escurrido el último centrifugado, agregar 5 c.c. de agua destilada (Hasta este tiempo corresponde el método de May-Grünwald).

XX gotas de Giemsa.

Tiempo de coloración: 20 minutos.

5 c.c. de agua destilada.

Centrifugado: 2500 Rev. Min. durante 5 minutos.

Escurrir el sobrenadante y agregar 10 c.c. de agua destilada.

Repetir esta operación de lavado y centrifugado unas 2 ó 3 veces, dependiendo del grado de transparencia del sobrenadante.

Una vez escurrido el último centrifugado, agregar 5 c.c. de agua destilada.

V gotas de formol.

Para el caso que se desee efectuar sólo el método de Giemsa, recomendamos la siguiente dilución:

XX gotas de material.  
XL " " agua destilada.  
XXX " " Giemsa.

Tiempo de coloración: 20 minutos.

Seguir los tiempos como se indicó anteriormente.

Aunque los colorantes empleados en nuestro caso fueron adquiridos en el comercio ya preparados para su uso, transcribiremos las fórmulas correspondientes.

May-Grünwald -- Solución en alcohol metílico de Eosinato de azul de metileno.

|                                |         |
|--------------------------------|---------|
| Giemsa -- Azur II eosina ..... | 3 g.    |
| Azur II .....                  | 0 g. 80 |
| Glicerina purísima .....       | 125 g.  |
| Alcohol metílico puro ....     | 375 g.  |

Aunque en Hematología se usa diluido, nosotros lo empleamos puro, teniendo en cuenta la dilución con el material.

### Resultado.

Cuando se ha realizado la tinción con la solución de May-Grünwald, según el procedimiento por nosotros indicado, se aprecia en el citoplasma, en especial de *Biddulphia sinensis* Grev., *Ditylum Brightwell*, *Coscinodiscus commutatus*, *Cosc. concinnus*, *Cosc. granii* y *Rhizosolenia calcar avis*, así como en *Rh. robusta*, un tono rosado con tendencia al azulado muy tenue, mostrando claramente las zonas de condensación citoplasmática. En una figura constituida por dos *Biddulphias* se observa la prolongación externa del citoplasma (coleoderma) indicando nítidamente la íntima relación de este elemento en la cadena, al mismo tiempo que una especie de condensación (de tono rosado más intenso) a modo de soldadura entre los dos coleodermas.

En *Pleurosigma affine*, se halla perfectamente delimitado el nódulo mediano, mostrando un color verde esmeralda muy refringente, lo que nos hace pensar en un probable fenómeno de metacromasia, en especial, porque este hecho se hace más evidente en el método combinado, en el que interviene el azul.

Todos los otros elementos toman coloración bien delimitada, mostrando sus núcleos perfectamente teñidos y en el caso de algunos *Coscinodiscus* de gran tamaño, se aprecia nítidamente el nucleolo con un rojo ladrillo bien refringente, que resalta sobre el azul oscuro del núcleo.

Al efectuar la coloración panóptica, se mantiene el aspecto general antes descrito, pero con una mayor intensidad y persistencia, sobre todo en lo que se refiere al citoplasma, el que presenta un tono rosado violáceo bien firme.

Entre las pruebas a que sometimos al método combinado se encuentra la tinción de materiales que se hallaban durante largo tiempo en formol, tal es el caso de una muestra obtenida el 21 de diciembre de 1945 y coloreada por May-Grünwald Giemsa el 23/X/56 (Tubo N° 8). Fuera de un previo lavado para retirar los restos de formol, se siguió la técnica ya expuesta. Los resultados fueron altamente satisfactorios, pudiéndose apreciar los mismos caracteres tintoriales que aparecen en los materiales recientes.



**Resultados de las coloraciones a través del tiempo.**

Consideramos oportuno, al realizar las diversas tinciones ya mencionadas, conocer los tiempos límites de duración de las mismas, debido al hecho de que se deben conservar en medio líquido, y por lo tanto se hallan expuestas a una decoloración progresiva. En tal sentido se mantuvieron dichos materiales coloreados, en las condiciones normales del laboratorio, así como montadas definitivamente en láminas porta-objetos, utilizando para tal fin el sistema ya expuesto en nuestro trabajo en colaboración con el Prof. F. C. Müller Melchers sobre "Técnica para el estudio de las Diatomeas" (UNESCO, 1957).

Damos a continuación los resultados obtenidos en las revisiones efectuadas de los diversos materiales. Las observaciones se hicieron regularmente —mes a mes—, pero a los efectos de simplificar la presente descripción, transcribiremos del libro de anotaciones, algunas de ellas, que a nuestro criterio ofrecen más interés.

**Hematoxilina férrica de Heidenhain** (Realizada el 15|X|56).

10|III|57. Se mantiene, sobre todo los núcleos y en menor grado los cromatóforos.

11|IX|57. Se mantiene el contraste nuclear especialmente, pero en general ha disminuido la intensidad de la coloración.

28|IV|58. Mantiene en parte el contraste de las estructuras teñidas (Biddulphias, Coscinodiscus, Ditylum, Rhizosolenia, Nitzschia), pero ya ha disminuido el tono general. Se anuló el material.

Conclusión: Duración estimable de 6 a 12 meses.

**Glicerohemalumbre de Carazzi** (Realizada el 16|X|56).

10|III|57. Mantiene ligera coloración de las estructuras.

11|IX|57. Se mantuvo algo en los núcleos, pero en general se hallan pocos vestigios de colorante. Se anuló.

Conclusión: Duración estimable de 3 meses.

**Eosina, Solución acuosa al 1%** (Realizada el 16|X|56).

10|III|57. Debilitado

11|IX|57. Ausencia total de coloración. Se anuló.

Conclusión: Duración estimable de 15 días a 1 mes.

**Hemalumbre-Eosina** (Realizada el 16/X/56)

10/III/57. Muy debilitada.

11/IX/57. Coloración nula. Se anuló.

Conclusión: Duración estimable de 15 días a 1 mes.

**Laca férrica-Eosina** (Realizada el 15/X/56).

10/III/57. Ausencia de coloración. Se anuló.

Conclusión: Duración estimable de 15 días.

**May-Grünwald** (Realizada el 18/X/56).

10/III/57. Mantiene perfectamente los caracteres tintoriales iniciales.

11/IX/57. Se mantiene muy bien la tonalidad del citoplasma (rosado pálido) y en los núcleos se aprecia una tinción violeta persistente.

28/IV/58. Mantiene la coloración. *Coscinodiscus* y *Ditylum* con el citoplasma de tono rosado como en la observación anterior. Esporos de resistencia de *Ditylum* Brightwell nítidamente teñidos. Los *Chaetoceros*, *Pleurosigmas*, *Biddulphias* y *Rhizosolenias*, se hallan un poco menos intensamente teñidos en su citoplasma. Se nota en algunas estructuras, como en los cromatóforos, un tinte verde esmeralda muy refringente. En general las estructuras basófilas están bien evidentes.

5/VI/58. Panorama igual al anterior.

Conclusión: Duración estimable de 18 a 24 meses. Se entiende que la duración límite, no la podemos expresar con certeza, por cuanto, en el momento de escribir este trabajo, los caracteres tintoriales siguen persistiendo.

**May-Grünwald Giemsa** (Realizada el 18/X/56).

10/III/57. Mantiene bien los tonos. Se diferencia del May-Grünwald, sobre todo en la tonalidad del citoplasma, en que el rosado adquiere una tendencia al violáceo.

11/IX/57. Mantiene bien. Se aprecian, en las *Biddulphia sinensis*, las características zonaciones del citoplasma. Otros géneros mantienen los colores como en el primer momento.

28/IV/58. La coloración se mantiene perfectamente en los siguientes géneros observados: *Ditylum*, *Coscinodiscus*, *Chaetoceros*, *Hemiaulus*, *Nitzschia*, *Biddulphia*, *Skeletonema*, *Thalassionema*, *Thalassiosira*, *Thalassiothrix* (aunque algo débil), *Navicula*, *Bacteriastrum*, *Lithodesmium*, *Pleurosigma*, etc..

5/VI/58. La coloración no ha variado en lo fundamental, manteniendo una marcada persistencia.

Conclusión: Duración estimable de 18 meses, y en lo que se refiere al límite máximo, nos sucede algo similar que con el May-Grünwald, pero creemos, en base a los hechos constatados hasta el momento, que el límite máximo para este método pánóptico debe ser mayor.

En cuanto a las preparaciones que hemos montado, tienen una duración de un año. Fueron realizadas con materiales coloreados con May-Grünwald solo o combinado con el Giemsa. El montaje se hizo con Alkarin, en lugar de Bálsamo de Canadá o Aceite de Cedro, pero evitando el procedimiento de la llama que se utiliza en los materiales oxidados.

### Coloración del frústulo.

Desde un principio de nuestras pruebas, nos ha preocupado conocer si el frústulo tomaba o no los colorantes. De los hechos registrados, podemos expresar que cuando trabajamos con material fresco —fijado con formol o Flemming— y al utilizar colorantes ácidos, el frústulo toma un color rojo más o menos intenso, en este caso por la presencia de eosina, hecho que se aprecia en especial, en las Diatomeas de gran tamaño, tales como *Biddulphia sinensis* y grandes *Coscinodiscus*.

También hemos realizado una tinción de May-Grünwald Giemsa en material oxidado intensamente por medio de ácido, a los efectos de tener la seguridad de ausencia de materia orgánica, y en este caso el fenómeno de tinción no se produce.

En base a estos datos, estamos inclinados a creer que lo que realmente se tiñe es una condensación periférica del citoplasma a la altura del frústulo y no la sustancia silíceo del mismo. Nos induce a sustentar este criterio, la acidofilia más marcada que se constata a ese nivel.

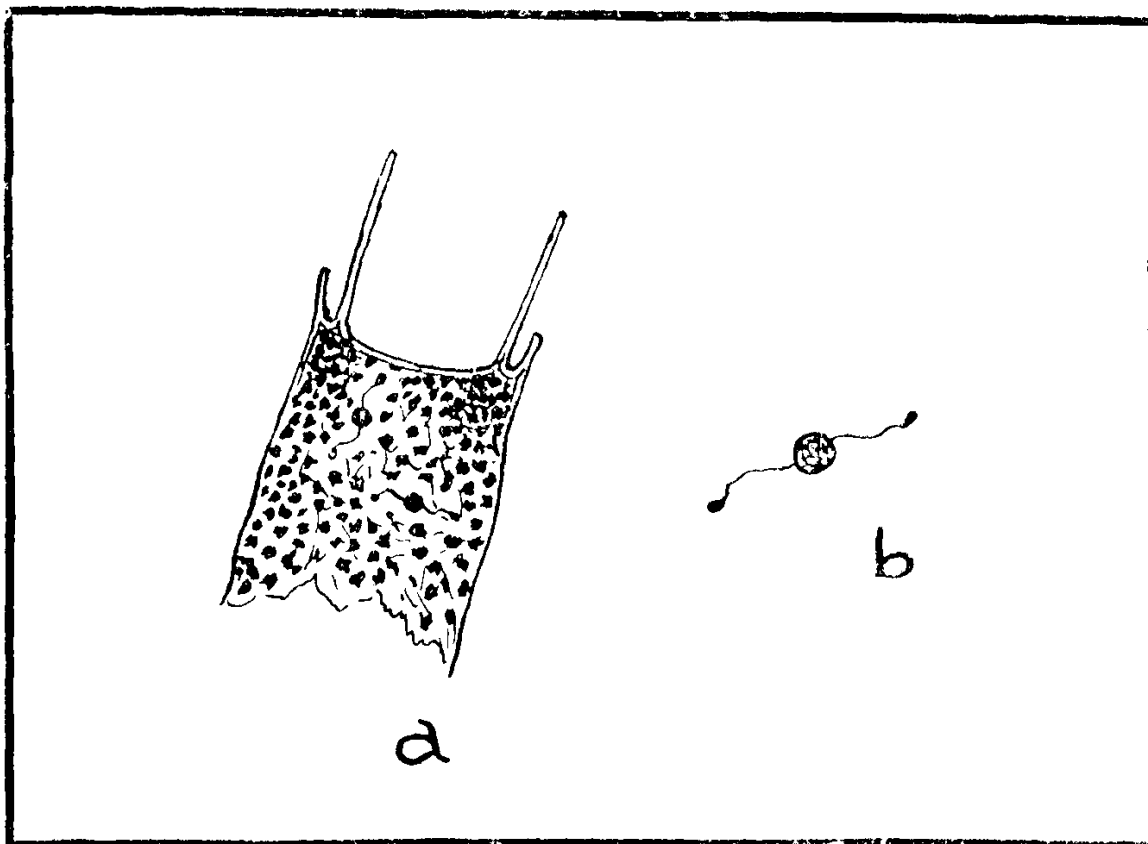


Fig. 1 Microsporos en *Biddulphia sinensis* Greville.

Coloración: Hematoxilina férrica de Heidenhain.

- a) Resto de *Bidd. sinensis*, mostrando dos microsporos en el citoplasma.
- b) Microsporo, en el que se aprecia un cuerpo esférico central, con un contenido filamentosos y las dos prolongaciones laterales terminadas en forma globosa.

Las siguientes tomas fueron realizadas mediante la técnica corriente, utilizándose el ocular Periplan Ok. 10x (Leitz) y el objetivo 42 Ap. 0.85 (Zeiss Winkel). Se usó película pancromática de velocidad media (Kodak Plus X, 50 ASA).

Como detalle de interés, indicamos que no se utilizó ningún filtro compensador, pues lo fundamental era obtener la impresión de las distintas tonalidades que ofrece el May-Grünwald Giemsa.

Material: Atlántida, costero, recolectado el 2/3/58 (At. 48, T. 22).

Coloración efectuada el 23/5/58.

Tomas fotográficas realizadas el 25/5/58.

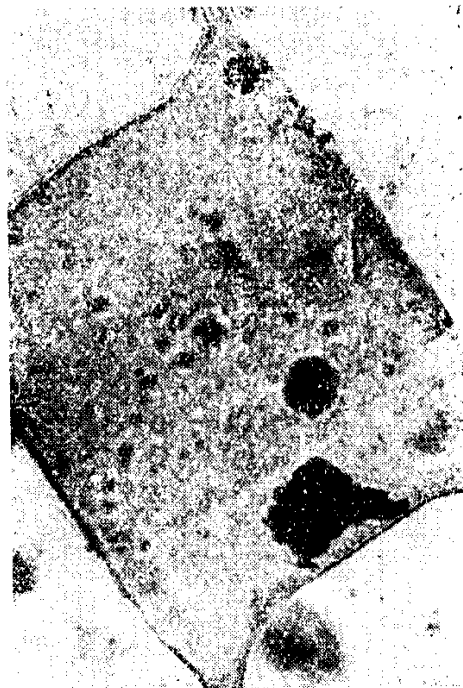
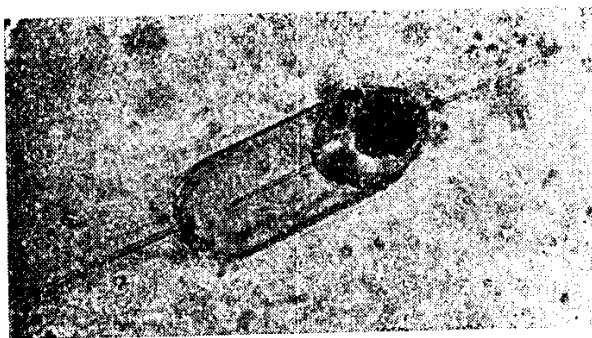


Foto N° 1 *Biddulphia sinensis* Gréville. Se aprecia la prolongación del citoplasma por fuera del frústulo y la condensación que se produce en la unión con el de la célula vecina.

Foto N° 2 *Bidd. sinensis* Grev., Distintas zonaciones evidentes en el citoplasma.



Fotos Nos. 3 y 4 *Ditylum Brightwellii* (West) Grunow. Esporos de resistencia y ciliias apicales.

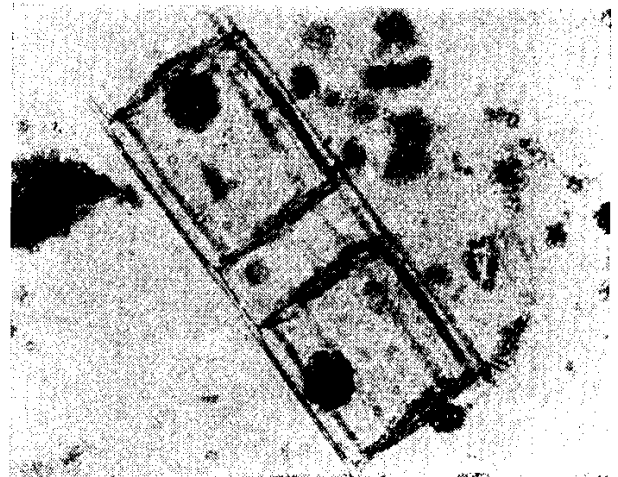
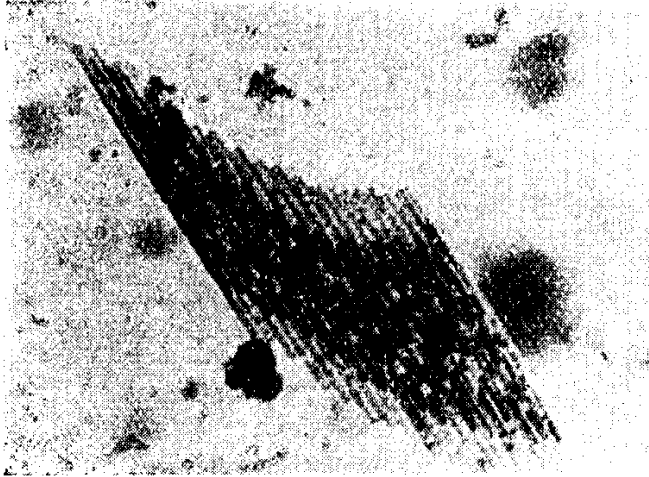


Foto N° 5 *Nitzschia paradoxa* (Gmelin) Grunow.

Foto N° 6 *Lithodesmium undulatum* Ehrenberg.

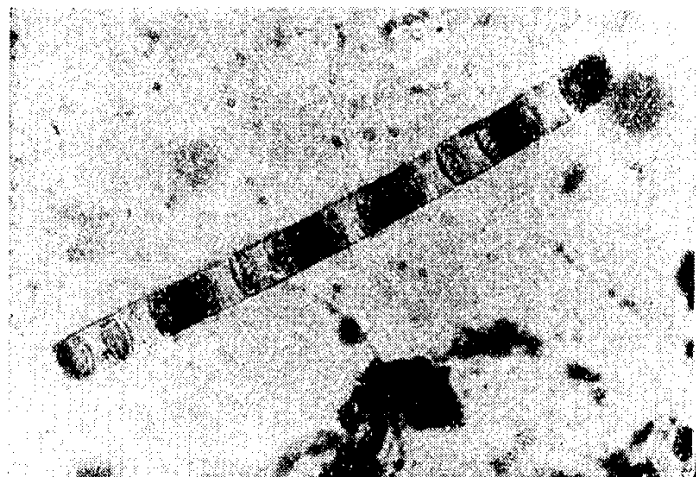
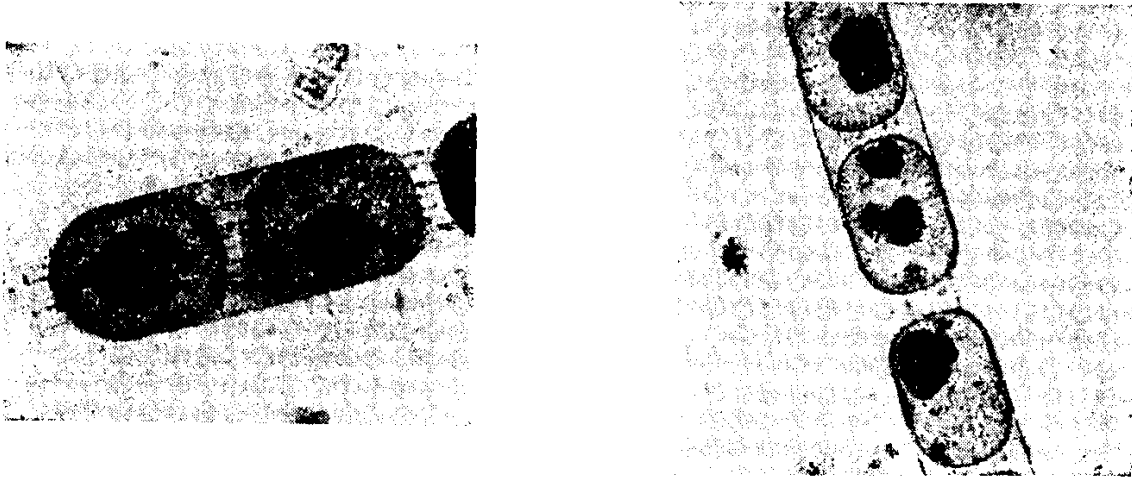


Foto N° 7 *Chaetoceros atlantidae* Müller Melchers. Esporo de resistencia.

Foto N° 8 *Skeletonema costatum* (Greville) Cleve.



Fotos Nos. 9 y 10 *Stephanopyxis turris* (Greville & Arnott) Ralfs. Se notan las prolongaciones del citoplasma, por fuera del frústulo.

### CONCLUSIONES

De los distintos colorantes empleados, nos decidimos por el May-Grünwald Giemsa, solos o combinados, puesto que dan la mayor variedad de tonalidades y han sido los que han superado, tanto las pruebas del tiempo de duración del material teñido, así como su adaptabilidad al mayor número de especies. Además, la fijación con formol (de preferencia neutralizado), no afecta mayormente los resultados finales de la tinción. No obstante, para el caso particular del May-Grünwald Giemsa, recomendamos el uso del fijador de Flemming (mezcla débil). Por otra parte es conveniente el uso de agua destilada neutra para las diluciones y lavados respectivos.

### RESUMEN

1º) Se estudian distintos tipos de colorantes, simples y combinados, aplicándolos mediante dilución en el material fitoplanctónico.

2º) De los métodos empleados, el que da mejores resultados ha sido el May-Grünwald Giemsa, en conjunto o por separado, siendo recomendable la utilización de la mezcla débil de Flemming como fijador previo.

3º) Se relatan los resultados obtenidos con otros colorantes, tales como Hematoxilina férrica, Hemalumbre, Eosina, etc..

### SUMMARY

1) There are different kinds of staining —simple or compound— on study, applied by dilution on the phytoplankton samples (Diatoms).

2) Of the methods we have employed, we found May-Grünwald Giemsa the best for the results we have achieved, isolated or as a whole. We find advisable the use of a weak Flemming mixture as a previous fixer.

3) We detail the results obtained with other stainings, such as Hematoxylin of Heidenhain, Haemalum, Eosin, and so on.

### ZUSAMMENFASSUNG

1. Es werden verschiedene Färbungen an Plankton untersucht, einfache und kombinierte, in verschiedener Verdünnung.

2. Von den Methoden die das beste Resultat ergaben, nat sich das May-Grünwald Gemisch ergeben.

3. Es ist angebracht eine verdünnte Lösung anzuwenden, nach vorhergehender Fixierung mit Flemming Gemisch. Es werden die Resultate mit anderen Färbungen ausgeführt — wie Eisen Hämatoxylin Heidenhain, Eosin und andere.

### BIBLIOGRAFIA CONSULTADA

- BAKER, J. R. — *Cytological Technique*. London, 1945.  
 CHAMBERLAIN, C. J. — *Methods in Plant Histology*. Chicago, 1933.  
 CORONA, L. T. — *Tratado de Quimica*. Santiago de Chile, 1937.  
 CUPP, E. E. — *Marine Plankton Diatoms of the West Coast of North America*. Bull. of the Scripps Inst. of Oceanography of the Univ. of Calif., Vol. 5, Nº 1, La Jolla, California, 1943.  
 DE ROBERTIS, E. D. P., NOWINSKI, W. W. y SAEZ, F. A. — *Citología General*. Buenos Aires, 1946.  
 GRESSON, R. A. R. — *Essentials of General Cytology*. Edinburgh, 1948.  
 JOHANSEN, D. A. — *Plant Microtechnique*. New York, 1940.  
 LANGERON, M. — *Précis de Microscopie*. Paris, 1949.  
 MAXIMOW, N. A. — *Fisiología Vegetal*. Buenos Aires, 1952.  
 MÜLLER MELCHERS, F. C. y FERRANDO, H. J. — *Técnica para el estudio de las Diatomeas*. Actas de las Sesiones y Trabajos Presentados a la IV Reunión del Grupo de Trabajo de Ciencias del Mar de la UNESCO. Montevideo, 1957.  
 ROMEIS, B. — *Guía-Formulario de Técnica Histológica*. Barcelona, 1936.  
 STRASBURGER, E., NOLL, F., SCHENCK, H. y SCHIMPER, A. F. W. — *Tratado de Botánica*. Barcelona, 1953.  
 SUBRAHMANYAN, R. — *Note on Handling Diatoms for Cytological and Life-History Studies*. The Microscope, Nov. Dec. 1951, London.  
 TAYLOR, F. B. — *Notes on Diatoms*. Bournemouth, 1929.  
 VARELA, M. E. — *Fundamentos de la Hematología*. Buenos Aires, 1947.