

RECOLECCIÓN Y PRESERVACIÓN DE MACROALGAS MARINAS: UNA GUÍA PARA ESTUDIOS FICOLÓGICOS.

COLLECTION AND PRESERVATION OF MARINE MACROALGAE: A GUIDE FOR PHYCOLOGICAL STUDIES.

Lennin Florez-Leiva, Brigitte Gavio, Marta Díaz-Ruiz, Olga Camacho y Guillermo Díaz-Pulido

RESUMEN

Conocer la forma adecuada de recolectar, preservar y conservar las macroalgas marinas es indispensable para generar colecciones biológicas que puedan ser utilizadas en diversas investigaciones (taxonomía, sistemática, ecología, evolución, etc.) y de igual forma brinden importantes herramientas para la educación. De esta forma, las colecciones se constituyen en patrimonio de la nación.

PALABRAS CLAVE: Algas marinas, biodiversidad, colecciones, herbario.

ABSTRACT

It is necessary to know the way to collect, preserve, and conserve marine macroalgae in order to generate biological collections that can be used for different research purposes (taxonomy, systematic, ecology, evolution, etc). Such collections also provide important educational tools. Thus, the collections constitute part of the national patrimony.

KEY WORDS: Marine algae, biodiversity, collections, herbarium.

Dirección de los autores:

Instituto de Investigaciones Tropicales -INTROPIC, Universidad del Magdalena, Santa Marta, Colombia (L.F-L., M.D-R., O.C., G.D-P). Departamento de Oceanografía, Universidad de Concepción, Chile (L.F-L). Departamento de Biología, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, Colombia (B.G). Instituto de Investigaciones Marinas y Costeras- INVEMAR, Santa Marta, Colombia (M.D-R). Department of Biology, University of Louisiana at Lafayette, LA 70504-2451, USA. (O.C) . Griffith School of Environment, Griffith University, Australia (G.D-P)



INTRODUCCIÓN

El conocimiento de las especies empieza siempre con la recolección y observación de especímenes que se obtienen directamente de la naturaleza (Lemaitre, 2002). Si éstos se mantienen en óptimas condiciones pueden aportar gran información científica y académica. Por esta razón, se constituyen las colecciones biológicas, las cuales se consideran como archivos históricos de la vida sobre la tierra (Duckworth et al., 1993; Simmons, 1999) y apoyan la investigación como base en estudios taxonómicos, sistemáticos, evolutivos, ecológicos, biogeográficos y moleculares, entre otros (Ramírez, 1995; Simmons y Muñoz-Saba, 2005). De la misma forma, estas colecciones son el soporte del patrimonio natural de una nación, al ser fuente primaria de conocimiento y de información sobre la biodiversidad de un país. Por tanto el objetivo de esta nota es facilitar a estudiantes, profesionales del campo de las ciencias marinas, interesados en la historia natural y jóvenes ficólogos, los procedimientos adecuados para la recolección, manipulación y preservación de macroalgas marinas.

Recolección de especímenes: campo

Para recolectar el material ficológico en la zona intermareal, se sugiere utilizar botas para protegerse de rocas, erizos, corales, etc., así como careta (máscara de buceo) para observar y desprender adecuadamente las algas del sustrato. En la zona submareal se utiliza equipo de buceo libre ó autónomo. Si se planea recolectar en el intermareal es mejor ir durante la marea baja, cuando las algas están expuestas y es más fácil su acceso, esto es particularmente relevante en el océano Pacífico, donde las mareas están bien definidas. Es necesario recolectar siempre los especímenes completos incluyendo las partes basales asociadas con el sustrato (estructuras de fijación), con la ayuda de espátulas o cuchillas. Si hay organismos en reproducción, es oportuno preferirlos, porque las estructuras reproductivas son, en muchos casos, esenciales como criterio de identificación (Ramírez, 1995). Para las algas coralinas costrosas, firmemente adheridas al sustrato se necesita un cincel y un martillo para removerlas. Para recolectar epífitos o algas pequeñas sobre sustrato sólido, es mejor incluir parte de éste y así evitar una posible pérdida de los especímenes o de estructuras relevantes en la identificación taxonómica (e.g., rizoides). De inmediato, el material algal debe ser guardado en frascos o bolsas plásticas sellables que contengan agua de mar (como “ziplock” o “whirl-pak”). Para algas muy pequeños o diminutas, es mejor utilizar frascos de menor tamaño y guardarlas de manera independiente con agua de mar.

Siempre es necesario rotular adecuadamente las muestras, para lo cual se utiliza papel pergamino comercial y lápiz. Se deben registrar los datos de campo tales como localidad, hábitat y profundidad, colector, fecha de recolecta y notas [e.g., color de los especímenes, forma (globosas como *Ventricaria* y otras algas como *Caulerpa*, cuya forma cambia con la preservación), textura (algunas algas tienen textura gelatinosa que se pierde posterior a su preservación), presencia de estructuras reproductivas, características del hábitat, etc.] que permitan posteriormente una correcta identificación (Acleto y Zúñiga, 1998) (Figura 1). Actualmente, se debe geo-referenciar el lugar donde se recolectan los especímenes, debido a que las muestras que son depositadas en Colecciones de Referencia o Museos requieren de esta información.

HERBARIO DE MACROALGAS
Universidad Jorge Tadeo Lozano
Biología Marina, Santa Marta

División: Chlorophyta N° _____ ← Dejar en blanco
Clase: Ulvophyceae
Orden: Cladophorales
Familia: Cladophoraceae
Cladophora vagabunda (Linnaeus) Hoek 1963

Lugar Recolecta: Aeropuerto de Santa Marta (Magdalena)
Hábitat y profundidad: Litoral rocoso
Submareal (1m. de prof.)
Coordenadas geográficas: (36°30' S-73°07' W)
Colectó e identificó: Barrera, Jara, Mahecha, Niño y Vivas.
Fecha: 28-09-04
Observaciones: tiene epífita a *Ceramium* sp.

Figura 1. Formato de etiquetas para colecciones de algas marinas.

Los frascos o bolsas con las algas pueden ser reunidos en baldes o neveras plásticas que permitan proteger el material de la radiación solar, tratando de mantener una temperatura óptima. Para realizar estudios moleculares se recomienda preservar las algas, inmediatamente después de su colecta, en sílica gel o alcohol al 95 % (Simmons y Muñoz-Saba, 2005).

Preservación en seco

Herbario

En esta nota se refiere a herbario como una colección de aquellas algas macroscópicas marinas que pertenecen a los phyla Cyanophyta (algas verde-azules), Rhodophyta (algas rojas), Heterokontophyta (incluye a las algas pardas) y Chlorophyta (algas verdes), que son preservadas, identificadas y acompañadas de toda la información pertinente sobre su colecta. Dicha información es actualmente documentada desde una base de datos digital, la cual facilita su consulta y

eventualmente puede llegar a alimentar sistemas de información de bases de datos más complejos, como por ejemplo a nivel nacional el Sistema de Información sobre Biodiversidad Marina SIBM (SIBM, 2010) y a nivel internacional AlgaeBase (Guiry y Guiry, 2010).

Para la conservación de los ejemplares en seco y de su información asociada, es necesario elegir de forma adecuada los materiales a emplearse. Existen diversos tipos de papel que se pueden conseguir en el mercado, especiales para realizar los montajes (Herbarium Supply, 2010). Sin embargo, si no es posible adquirir estos papeles se recomienda usar papel de color blanco libre de ácido, con un pH neutro (tipo cartulina). De igual forma es necesario usar un pegante libre de ácido (alcohol polivinílico) para fijar las etiquetas; si no se tiene estos materiales, se puede utilizar octavos de cartulina normal blanca, sin embargo, a largo plazo las algas se pueden deteriorar más rápidamente.

Es mejor empezar a prensar las algas de mayores dimensiones, para eliminar rápidamente el volumen de muestras. Si los organismos fueron puestos en formol, éstos deben ser introducidos en un balde con agua de mar para lavar el exceso de fijador. Alternativamente se puede utilizar agua dulce, pero las células pueden dañarse en algunos casos. Si las algas fueron preservadas en alcohol, es necesario ponerlas en una solución de 1:1 alcohol/agua por 15-20 minutos antes de ser prensadas (Tsuda y Abbott, 1985). Generalmente las algas preservadas en alcohol se rompen más fácilmente una vez secas, además de que pierden su coloración rápidamente. Pueden también prensarse algas sin previa fijación (condición ideal), aunque requieren cuidado particular posterior para evitar formación de hongos. Es necesario registrar en el cuaderno de apuntes (y posteriormente en la base de datos y etiqueta) si el alga fue fijada previamente antes de ser prensada y qué solución fue utilizada.

Con ayuda de un pincel o pinzas se debe eliminar toda la arena, concha u otros organismos y eventualmente los epífitos para preservarlos separadamente, rotulándolos y anotando sobre qué muestra fueron encontrados. En una bandeja plástica o esmaltada de tamaño adecuado, adicionar suficiente agua para cubrir el alga y sumergir el papel para herbario de tamaño similar al espécimen por preservar, previamente marcado

con un lápiz con el número de colección, fecha y lugar. Posteriormente es necesario colocar el alga sobre el papel en donde el número de colección debe estar asociado a la muestra y a sus datos. Con pinzas, agujas ó para las algas más delicadas, con un pincel suave o con las manos, tender y organizar la muestra para mostrar el patrón de ramificación y las estructuras importantes para su identificación. Si es necesario, se elimina parte de las ramificaciones (registrando qué se hizo) para permitir observar todas las estructuras, con cuidado de no dañar o remover sus estructuras de fijación ó reproductivas, si estas últimas han sido observadas.

De inmediato se debe colocar encima de la muestra cubriéndola totalmente, un pedazo de tela (de algodón suave), liencillo delgado, papel encerado (para las algas más delicadas), o un retazo de media velada, con el fin de proteger el espécimen y evitar que se desprenda del papel. Posteriormente, se ubica el papel absorbente especial para herbarios o un estrato de papel periódico sobre y debajo de este montaje. De la misma forma es necesario disponer de dos pedazos de cartón preferiblemente corrugado o láminas de aluminio que permiten la circulación de aire, un secado más rápido y mejores resultados (Dawson, 1966). Continuar este mismo procedimiento con otras muestras y apilarlas una sobre otra. Cuando hay alrededor de 25-30 muestras, es necesario ubicar bien las dos partes (inferior y superior) de la prensa para herbario con todo el material en la mitad y jalar los tirantes (y/o cierre los tornillos), apretando lo más posible. Alternativamente si no hay una prensa, dos tablas de madera lisa de un tamaño levemente mayor que el papel de herbario, puede servir. En este caso, se sitúa una tabla de madera arriba y otra debajo de todo el material apilado. Encima de la madera superior se pone unas pesas bien distribuidas sobre la superficie y se deja secar normalmente, o con la ayuda de un ventilador. Es necesario cambiar los periódicos diariamente hasta que las muestras estén completamente secas. Se recomienda no quitar la tela o papel encerado que está sobre cada alga hasta que el montaje esté totalmente seco para prevenir que el alga se desprenda.

La prensa puede localizarse cerca de una fuente de calor u horno secador (40-50 °C). En este caso, no es necesario el cambio de periódico. Cuando se utilicen secadores es necesario darle vueltas a la prensa durante el secado, de tal

forma que el secado del material sea homogéneo y así garantizar que todas las muestras reciban el mismo tratamiento. El tiempo de secado de las algas es de tres a siete días dependiendo del grosor y otras características de los talos. En el horno este procedimiento es más rápido y debe ser supervisado frecuentemente. Una vez secas, se deben dejar enfriar completamente las muestras antes de sacarlas de la prensa, de lo contrario el papel se arruga, en algunos casos dañando el alga.

Muchas algas quedan pegadas al papel una vez secas. Sin embargo, las algas más gruesas (e.g., algas pardas) se pueden desprender fácilmente. En este caso es posible sujetarlas al papel por medio de pequeñas tiras de papel libre de ácido (e.g., papel kimberly) pegadas en sus extremos con alcohol polivinílico. Alternativamente se puede también coser con hilo para herbarios al papel en algunos puntos clave.

Los ejemplares voluminosos, especialmente formas calcáreas (e.g., *Halimeda*, *Amphiroa*) y especies costrosas adheridas a rocas ó conchas (familia Corallinaceae), pueden ser guardadas en pequeñas cajas apropiadas en cartón estándar libre de ácido (Dawson, 1966). Muchas algas coralinas genículadas (e.g., *Amphiroa* y *Jania*) se rompen fácilmente una vez secas. Estas algas pueden remojarse en solución de formalina con 10-40 % de glicerina (la glicerina retiene la flexibilidad de la genícula y previene la fragmentación y la formalina o fenol evita el crecimiento de bacterias y hongos), por varios días o semanas antes de ser secadas y guardadas en cajas pequeñas (Womersley, 1984) o en un sobre de papel encerado, atado a la hoja de papel herbario.

Una vez que las muestras estén bien secas, se procede a pegar el papel con los ejemplares (usando alcohol polivinílico) en el papel de herbario de tamaño estándar (43 cm de largo x 29 cm de ancho). Posteriormente, se coloca la etiqueta de papel libre de ácido, en la parte inferior derecha del papel. En dicha etiqueta debe aparecer la información básica tal como el nombre de la especie (binomial, incluyendo los autores), lugar (nombre del sitio, ciudad, país), fecha de colección, nombre del colector, hábitat, profundidad y número de catálogo. Información complementaria como el tipo de sustrato, forma de recolectada (SCUBA o dragado), anotaciones morfológicas importantes, información ecológica

de interés, nombre de quién identificó y coordenadas geográficas deben reposar en la base de datos y en un formato impreso debido a las limitaciones de espacio en dicha etiqueta. La impresión se debe realizar con una impresora térmica (se requiere papel especial) o en impresora de matriz de punto, para evitar que con el tiempo la tinta se borre con los solventes. La escritura en tinta china o impresión en cartulina opalina impresa en láser, son otras opciones, especialmente para la preservación en líquido.

Mica

Los especímenes pequeños, difíciles de montar en herbario, pueden ser montados en rectángulos pequeños de mica (minerales pertenecientes a un grupo numeroso de silicatos de alúmina, hierro, calcio, magnesio y minerales alcalinos caracterizados por su fácil exfoliación en delgadas láminas flexibles, elásticas y muy brillantes). La mica se compra en pilas y para el montaje se separa un estrato poco más grande que el alga. La mica se utiliza como la cartulina de herbario, pero no se pone en agua. El alga es posicionada sobre la mica y con la ayuda de un pincel húmedo o un fórceps, se extiende bien. Un pedacito de papel encerado se dispone encima y se procede a secar como para las muestras en herbario (Tsuda y Abbott, 1985). El número de colección se escribe directamente sobre la mica. Una vez secas, las muestras sobre la mica pueden ser dispuestas en un sobre de papel unido a la cartulina del herbario.

Sílica gel

En estudios moleculares es utilizada la sílica gel para conservar las muestras secas antes del procedimiento respectivo. Solo es necesario un pequeño fragmento del alga o el alga completa si es muy pequeña (el talo debe estar libre de epífitos y de impurezas). La limpieza de los talos o fragmentos, se debe realizar bajo el estereoscopio con ayuda de pinceles y pinzas delicadas (los implementos utilizados, excepto el papel deben ser limpiados con alcohol y secados). Una vez que estén limpios, éstos pueden ser guardados en un pedazo de papel de arroz (para especímenes muy pequeños) e introducidos en una bolsa tipo ziplock o frascos pequeños de tapa plástica (previamente rotulados) con suficiente sílica gel; para un mejor secado, se puede pulverizar la mitad de la sílica, la otra mitad puede dejarse granulada, teniendo siempre presente que el espécimen quede totalmente cubierto.

Preservación en líquido

Formalina

Se diluye el formol líquido comercial (37 % formaldehído = 100 % formol) en agua de mar a una solución de 3-5 % (o formalina). A esta solución se le añade bicarbonato de sodio (40 g/l) como amortiguador, algunas veces bórax (borato de sodio). Las muestras son sumergidas completamente en ésta solución, en frascos de vidrio con tapa plástica (no usar tapas metálicas) y sellados con parafilm o parafina para evitar la evaporación (Figura 2). Los frascos deben ser mantenidos en la oscuridad, para evitar la decoloración de las muestras. Se recomienda la manipulación de formol y formalina con suma precaución, como se menciona más adelante. Para preparar una solución de formalina al 4 % se utiliza la siguiente fórmula $V_1C_1 = V_2C_2$ [donde V_1 : volumen a calcular o la cantidad de formol necesario para hacer la solución; C_1 : concentración del formol comercial (e.g., 37 %); V_2 : volumen de agua de mar o de la solución final (e.g., 1 l); y C_2 : 4 % de la solución final].



Figura 2. Modo de preservar colecciones de algas marinas en líquido

Alcohol

Para estudios morfológicos de macroalgas se usa etanol al 70 %. Sin embargo, algunas muestras se deterioran si son mantenidas por largo tiempo en esta sustancia, y se decoloran mucho más rápidamente que en formol, incluso si están en la oscuridad (el alcohol es un disolvente de la clorofila). No obstante, el alcohol es menos peligroso para manipular que el formol. Para estudios moleculares se recomienda utilizar alcohol al 95 % (Simmons y Muñoz-Saba, 2005).

Formol-ácido acético-alcohol

Se prepara con 100 ml de etanol (50 %), 6,5 ml formol comercial y 2,5 ml ácido acético glacial. No se puede utilizar para organismos calcificados, porque el ácido disuelve el carbonato de calcio. Independientemente del conservador líquido utilizado, siempre los frascos deben ser mantenidos en la oscuridad, para evitar la decoloración de las muestras y deben ser rotulados con la información mencionada anteriormente. Esta mezcla es recomendada para preservar estructuras celulares y flagelos.

Preparación de micropreparados

Los micropreparados ó preparaciones semipermanentes se utilizan cuando se ha concluido con la identificación y se quiere mantener material de referencia ó cuando se tienen especímenes diminutos (e.g., Ceramiaceae). Además, esta técnica sirve para observar detalles de la estructura del talo (órganos de fijación, reproducción, células medulares, córtex, etc.). Para hacer un micropreparado se requiere ser cuidadoso al escoger la estructura que se desea fijar y seccionarla apropiadamente.

Micropreparados en Karo-syrup ó miel Karo

Las muestras para micro preparados se fijan en formalina (15-30 minutos para las algas delicadas, hasta 24 horas para las formas más cartilaginosas). Posteriormente, se enjuagan con agua destilada para eliminar el exceso de formol y se procede a su tinción. Se ponen unas gotas de azul de anilina (1 % solución acuosa), después de unos minutos se acidifica con una gota de 1 % HCl para fijar el color y pasados unos tres minutos se enjuaga con agua destilada, eliminando el exceso de agua con un papel absorbente, teniendo cuidado de no llevarse el espécimen o corte (Taylor, 1960; Dawson, 1966; Womersley, 1984; Price y Scott, 1992; Ramírez, 1995). Aparte, se prepara una solución de Karo Syrup (miel de Karo) diluida en agua marina filtrada, más unas gotas de formalina, la concentración a utilizar depende del alga (50 %, 25 % y 15 %, el menor porcentaje para especímenes más delicados). Se le agregan de 1 a 3 gotas al espécimen que está sobre el portaobjetos. Finalmente, se cubre este montaje con un cubreobjetos (apoyando un lado y dejándolo caer lentamente con ayuda de una aguja de disección) y se deja secar varios días.

Si se presentan burbujas, agregar más de esta solución por los bordes y dejar secar nuevamente, finalmente se sella por los bordes con esmalte transparente. Si no se tiene miel Karo se puede utilizar glicerina (solución al 5 %) aplicando el mismo procedimiento.

Las algas que precipitan carbonato de calcio en la pared celular (e.g., Corallinaceae) necesitan ser descalcificadas antes del montaje y/o corte. Para esto se sumergen en una solución de ácido clorhídrico al 1 %, hasta que la descalcificación sea completa (el carbonato de calcio, en contacto con el ácido, reacciona liberando dióxido de carbono en forma de burbujas). Cuando todo el carbonato se ha consumido, termina la producción de burbujas y a continuación si es necesario las algas pueden ser seccionadas y luego se procede a su tinción. En algunos casos es más fácil realizar los cortes antes de la descalcificación y esta decisión dependerá de la naturaleza de los talos y de la experiencia del investigador.

RECOMENDACIONES

Es necesario saber o conocer cuáles son los objetivos del estudio para determinar el mejor procedimiento para la recolección y preservación de las macroalgas. De igual forma es muy importante que algunos de los especímenes sean donados a herbarios nacionales. Por tanto, es recomendable conocer las especificaciones o pautas de dichas instituciones para realizar la donación bajo los estándares establecidos.

Manejo de los químicos

Algunos de los químicos mencionados en la preservación de las muestras son considerados peligrosos. Por ejemplo, el formol es carcinogénico, mientras que los ácidos son corrosivos. Se sugiere un extremo cuidado durante el manejo de estos químicos y la utilización de protectores como guantes, gafas y máscaras para evitar la inhalación de los humos. Siempre que se utilice formol, es conveniente utilizar una campana de extracción. La disposición final (desecho) de estas soluciones es reglamentada estrictamente, así que se sugiere consultar las fichas internacionales de seguridad química para cada una de ellas (IPCS, 2010).

Manejo de los especímenes prensados con algún grado de infección

Para las macroalgas se pueden utilizar los mismos procedimientos establecido para las plantas superiores, especialmente cuando son atacadas por hongos u otros organismos. Se sugiere utilizar ácido benzoico al 1 % con un poco de alcohol y con un pincel frotar suavemente sobre el material. En algunos casos se recomienda agregar xylool o lysol con una brocha sobre el ejemplar (Anónimo, 2008). Los jardines botánicos realizan actividades de fumigación sobre las instalaciones del herbario, sin embargo estas prácticas requieren de conocimiento sobre el material, debido a su susceptibilidad y al grado de infestación de las muestras (Esquivel, 1997). Si se quiere más información sobre este apartado se sugiere visitar la página web del Museo Smithsonian en Panamá (STRI, 2010)

Ética

Es importante considerar que la biodiversidad es uno de los bienes más grandes de un país. La protección y la conservación de la flora y la fauna es un deber de todo ciudadano, así que es necesario evitar un muestreo destructivo. Se debe recolectar la mínima cantidad de muestra, tratando de dejar en el campo individuos de cada especie y evitar remover todos los individuos fértiles. Es necesario tener en cuenta las normativas de cada país en lo referente a los permisos de colecta, movilización y acceso a recursos genéticos, entre otros. En el caso colombiano se pueden consultar los procedimientos a seguir en la página web de Ministerio de Ambiente, Vivienda y Desarrollo Territorial (MAVDT, 2000).

AGRADECIMIENTOS

Esta nota es un tributo al Dr. Germán Bula-Meyer (q. e. p. d).

BIBLIOGRAFÍA

Acleto, C. y R. Zúñiga. 1998. Introducción a las algas. Editorial Escuela Nueva, S.A. Lima, Perú 383 p.

Anónimo. 2008. Protocolo de manejo de colecciones de plantas vasculares "Desarrollando capacidades compartiendo tecnología para la gestión de la biodiversidad en Centroamérica". 46 p.

Dawson, E.Y. 1966. Marine botany an introduction. Holt, Rinehart yWinston. Nueva York, EU. 371 pp.

RECOLECCIÓN Y PRESERVACIÓN DE MACROALGAS MARINAS:
UNA GUÍA PARA ESTUDIOS FICOLÓGICOS.

- Duckworth, W.D., H.H. Genoways y C.L. Rose. 1993. Preserving natural science collections: chronicle of our environmental heritage. National Institute for the Conservation of Cultural Property, Inc. Washington, D.C. iii + 140 p.
- Esquivel, H.E. 1997. Herbarios en los Jardines Botánicos. Ibagué (Tolima), Colombia 30 p.
- Guiry, M.D. y G.M. Guiry. 2010. Algaebase. World-wide electronic publication, National University of Ireland, Galway. Disponible en: <http://www.algaebase.org>
- Herbarium Supply. 2010. Herbarium Supply online. Disponible en: http://www.herbariumsupply.com/nu_dynamicIndex.asp
- IPCS. Programa Internacional de Seguridad de las Sustancias Químicas. 2010. Disponible en: http://training.itcilo.it/actrav_cdrom2/es/osh/kemi/alfagem.htm
- Lemaitre, R. 2002. Biodiversidad: una historia natural. Pp. 55-64. En: Universidad Jorge Tadeo Lozano (Ed.). Biodiversidad una cuestión de vida, Revista La Tadeo, N° 67, Bogotá, Colombia. 223 p.
- Majer, J. D. 1985. Recolonization by ants of rehabilitated mineral sand mines on North Stradbroke Island, Queensland, with particular reference to seed removal. Australian Journal Ecology. 10: 31-48.
- Majer, J. D. 1992. Ant recolonization of rehabilitated bauxite mines of Pocos de Caldas, Brazil. Journal of Tropical Ecology. 8: 97-108.
- MAVDT. 2000. Ministerio de Ambiente, Vivienda y Desarrollo Territorial de Colombia. Decreto 309 del 2000. Disponible en: http://www.minambiente.gov.co/documentos/5452_040510_proy_dec_articulo_17_200510.pdf
- Molano, A. 1994. Hormigas (Hymenoptera: Formicidae) del bosque seco tropical y de agroecosistemas de la región de Zambrano, Bolívar. Tesis de Grado, Universidad Nacional de Colombia, Santafé de Bogotá, 227 p.
- Palacio, E. 1999. Capítulo 5. Hormigas legionarias (Hymenoptera: Formicidae: Ecitoninae) de Colombia. En: F. Fernández, G. Amat y G. Andrade (eds.) Insectos de Colombia: volumen II. Universidad nacional. Academia colombiana de ciencias, Santafé de Bogotá, Colombia. 117-189.
- Price, I. y F. Scott. 1992. The turf algal flora of the Great Barrier Reef. Part I.: 266 p. Rhodophyta. Townsville, Botany Department, James Cook University, Australia
- Ramírez, M.L. 1995. Recolección y colecciones científicas de macroalgas marinas. pp: 417-428. En: Alveal K., M.E. Ferrario, E.C. Oliveiray E. Sar. (Eds). Manual de métodos ficológicos. Universidad de Concepción, Chile, 863 p.
- Roth, D. S., I. Perfecto y B. Rathcke. 1994. The effects of management systems of ground foraging ant diversity in Costa Rica. Ecology Applied. 4(3): 423-436.
- Serna, F. J. y E. Vergara. 2001. Claves para la identificación de subfamilias y géneros de hormigas de Antioquia y Chocó, Colombia. Revista Instituto de Ciencias Naturales 7 (1): 5-41.
- SIBM. Sistema de Información sobre Biodiversidad Marina. 2010. Disponible en: <http://siam.invemar.org.co/siam/sibm/index.htm>
- Simmons, J.E. 1999. Colecciones de Historia Natural: almacenamiento de colecciones y datos a largo plazo. Asociación para la conservación del patrimonio cultural de las Américas. Boletín 9(2):3-6.
- Simmons, J.E. y Y. Muñoz-Saba. 2005. Cuidado, Manejo y Conservación de las colecciones biológicas. Universidad Nacional de Colombia. 288 p.
- Statgraphics, Net. 2002. Statgraphics. (Data analysis software system), version 5.1 Disponible en: www.statgraphics.net
- STRI. Smithsonian National Museum of Natural History. 2010. Algae Research. Collection and Preservation. Disponible en: <http://botany.si.edu/projects/algae/collpres.htm>
- Taylor, W.R. 1960. Marine algae of the eastern tropical and subtropical coast of the Americas, University of Michigan Press, Ann Arbor, Michigan ix + 870 p.
- Tsuda, R.T. y I.A. Abbott. 1985. Collection, handling, preservation and logistics, pp. 67-68. En: Littler M.M. y D.S. Littler (Eds.), Ecological Field Methods: Macroalgae. Handbook of Phycological Methods. Cambridge Univ. Press, New York, 617 p.
- Villareal H., M. Álvarez, S. Córdoba, F. Escobar, G. Fagua, F. Gast, H. Mendoza, M. Ospina y A.M Umaña. 2004. Manual de métodos para el desarrollo de inventarios de biodiversidad. Programa de inventario de Biodiversidad. Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt. Bogotá, Colombia. 236p.
- Whitford, W. G. 1978. Structure and seasonal activity of Chihuahua desert ant communities. Insectes Sociaux 25: 79-88.
- Womersley, H.B.S. 1984. The marine benthic flora of Southern Australia. South Australian Government Printing Division Part I: 329 pp.

Fecha de recepción: 20/02/2009
Fecha de aceptación: 08/04/2010

