ANALES

DE LA SOCIEDAD ESPAÑOLA

DE HISTORIA NATURAL.

MARINE BIOLOGICAL LABORATORY
WOODS HOLE
LIBRARY
MASS.

TOMO VIGÉSIMO.

MADRID:
DON I. BOLÍVAR, TESORERO.
CALLE DE ALCALÁ, 11, TERCERO.

1891.

MÉTODOS USADOS EN LA ESTACIÓN ZOOLÓGICA DE NÁPOLES PARA LA CONSERVACIÓN DE LOS ANIMALES MARINOS,

POR

DON SALVADOR LO BIANCO,

TRADUCIDOS POR

DON M. CAZURRO.

MARINE BIOLOGICAL LABORATORY WOODS HOLE LIBRARY MASS.

(Sesión del 1.º de Julio de 1891.)

La publicación de los métodos usados en la estación zoológica de Nápoles para la conservación de los animales marinos, ha sido un verdadero acontecimiento, ansiosamente esperado por todos los que se interesan en los estudios biológicos. Los magníficos resultados obtenidos en la preparación de los animales del golfo de Nápoles, cuyas colecciones formadas por dicha Estación zoológica puede decirse que no hay Museo ni centro de enseñanza que no posea, juntamente con los escasos resultados obtenidos por los antiguos métodos, habían excitado vivamente la curiosidad y hecho esperar con impaciencia la publicación de estos métodos.

Tan evidente era la supremacía de éstos procedimientos sobre los antiguos, que muchos Museos habían renunciado á ver figurar en sus ricas colecciones infinidad de seres, por creer imposible su conservación; y de otros, los ejemplares que se poseían, se hallaban en un estado tal, que hacía imposible su reconocimiento, siendo de todo punto imposible utilizarlos para estudio ninguno.

No es, pues, de extrañar que las preparaciones de la Estación zoológica de Nápoles, en tan diferentes condiciones de las anteriores, hayan excitado el entusiasmo y la admiración, al ver el completo éxito que se ha logrado en la conservación de

los más delicados animales, sorprendiéndolos en sus formas y actitudes naturales y dándoles la verdadera apariencia de una vida y duración perpetuas.

Pero no se ha llegado de pronto y sin trabajo á este magnífico resultado; han sido precisos numerosos años y laboriosas investigaciones del personal científico de dicha Estación y muy especialmente de su conservador, el ilustre Salvador Lo Bianco, inventor de la inmensa mayoría de estos métodos, para poder dar por terminada una obra tan interesante como útil, que cada día, sin embargo, se perfecciona más y más con la experiencia y trabajo del que puede decirse es casi su único autor.

El deseo de presentar esta obra ya terminada y depurada por la experiencia, y razones de diversa índole que en el prefacio de este trabajo indica el director de dicho establecimiento, el preclaro Profesor, A. Dohrn, han venido retrasando hasta una época reciente la publicación de estos procedimientos, que, sin embargo, se enseñaban á los oficiales de Marina de todas las naciones, entre ellas de la nuestra, que concurrían á aprenderlos para luego poderlos aprovechar en el curso de sus viajes y formar colecciones de animales marinos de los remotos países que tuvieran ocasión de visitar.

Cierto que antes de la publicación de estos métodos se habían ya adelantado por diversos naturalistas extractos de ellos, de los que es seguramente el más completo el publicado, por nuestro compatriota é ilustrado consocio, D. Joaquín María de Castellarnau, que en el año de 1883 residió en dicho laboratorio y tuvo ocasión de conocerlos bien.

Hoy, una vez publicados en los *Mittheilungen aus der Zoologischen Station zu Neapel*, vol. IX, c. 3, las principales revistas zoológicas de todos los países se han apresurado á dar noticias de ellos, ya publicando ligeros extractos, como el *American Naturalist*, vol. XXIV, núm. 285, ó más extensos, como el que el bibliotecario de la Estación, S. Schiemenz, publicó en el *Zeitschrift für wissenschaftliche Mikroscopie*, 1891, volumen VIII, páginas 54-56; ó ya verdaderas traducciones, como la publicada en el *Bulletin Scientifique de la France et de la Belgique*, vol. XIII, 1891.

Por mi parte he creído que en nuestra patria, por lo mismo que es poco lo que se conoce de su fauna marina, sería muy

interesante el poder aprovechar la aplicación de estos métodos para su estudio, y facilitar esta por medio de una traducción que permitiera el adquirir ejemplares de este trabajo, ya en gran parte agotado, á todos los que en nuestra patria se interesan por el conocimiento de nuestra fauna (1).

Por esto, aprovechando mi estancia en la Estación zoológica, como comisionado por el Ministerio de Fomento, me he apresurado á solicitar de su autor, el comendador Lo Bianco, la oportuna autorización para emprenderla: permiso que me fué desde luego concedido gracias á la amabilidad que todos los que le conocemos, sabemos posee, y á la simpatía que siempre ha demostrado á todos nuestros compatriotas que han pasado por aquel laboratorio.

Conste, pues, aquí el testimonio de mi gratitud al Sr. Lo Bianco, no solo por este gran favor que me ha concedido, sino por la amistad que siempre me ha demostrado. Y juntamente conste también mi agradecimiento al ilustre director y propietario de dicho establecimiento, el Profesor A. Dorhn, á su vice-director, el Profesor Eisig y al Profesor Mayer, por todas sus bondades para conmigo y por las constantes muestras de favor que siempre me han dispensado.

Una advertencia he de hacer solamente para finalizar, y es que quizás pueda creerse por algunos que en este trabajo se trata de ocultar los verdaderos métodos usados en la Estación para conservar los animales. Prejuicio es este, que el que le abrigue debe desechar por completo, porque estos procedimientos se practican á la vista de todos, se enseñan al que lo desea y nada hay en ellos de oculto. Si algo falta en él para que cualquiera pueda obtener los magníficos resultados que en la Estación se obtienen, es solamente la práctica, imposible de aprender en libro alguno. Todos los que en dicha Estación han trabajado, y aun yo mismo, hemos podido conseguir por estos métodos la conservación de las más delicadas formas animales.

---

(1) Durante la impresión de este trabajo he recibido un ejemplar de la «Memoria presentada al Excmo. Sr. Ministro de Marina, acompañando las colecciones zoológicas preparadas en Nápoles por el teniente de navío D. Joaquín Borja». En ella su autor da cuenta en extracto de estos métodos, que ha tenido ocasión de practicar durante su permanencia en dicha Estación.

¡Ojalá! pues, esta traducción, por mala que sea, anime á muchos á intentar practicar estos métodos, que, por poco cuidado y paciencia con que se empleen, han de dar buenos resultados, y contribuir al conocimiento de nuestra fauna marina, obra interesante é imposible sin el concurso de muchos trabajadores.

Nápoles, Mayo 1891.

MANUEL CAZURRO.

OBSERVACIONES PRELIMINARES.

La publicación de los métodos de conservación que desde hace años vienen siendo usados en la Estación zoológica, será acogida con placer por todos los que en estos estudios trabajan. Con la necesidad, cada día mayor, de hacer entrar las faunas oceánicas en el dominio de las investigaciones zoológicas, se hace sentir cada vez más la precisión de conservar en buen estado nuevas y numerosas formas; de este modo, la gran extensión que ha adquirido la fauna del golfo de Nápoles, así conservada, ha puesto ante los ojos de las numerosas personas que á estos estudios se dedican, el contraste que existe entre los métodos actuales y los empleados hasta hoy; el resultado de esta comparación no ha podido ser otro que el deseo de que estos métodos entren en el dominio de todos.

Créase, ciertamente, sobre su palabra, al autor de estas líneas, que se interesa tanto en el progreso de las ciencias como cualquier otro, y aun ha tenido ocasiones de prestar á la biología servicios más importantes que la publicación de los nuevos métodos de conservación. Si hasta ahora se ha abstenido, á pesar de los numerosos y reiterados ruegos y exhortaciones, que le han sido dirigidos, de publicar estos métodos, es porque tenía para esto serias razones; estaba en el derecho de esperar á que se tuviera bastante confianza en él, aun sin conocer estas razones, para creer que no obraba así por capricho, sino guiado por motivos bien fundados. Había esperado hace algunos años, para hacer esta publicación, otra circunstancia que ha tardado en presentarse, y que ha retardado la publicación de estos métodos.

Al fin, en Enero de 1889, he adquirido la seguridad de que convenía su publicación, y he confiado al Sr. Lo Bianco la misión de exponer los métodos en la forma en que ahora van á aparecer.

¡Ojalá puedan rendir todos los servicios que de ellos se esperan!

ANTÓN DOHRN.

PREFACIO.

Ocupado desde hace varios años en la Estación Zoológica de Nápoles en la conservación de los animales marinos, he tratado continuamente de mejorar la técnica con el fin de obtener las formas animales, en todo cuanto posible sea, con las dimensiones y aspecto que presentan vivas, de manera que puedan conservarse en el alcohol durante un tiempo relativamente largo.

A esto me ha movido el ver el lastimoso estado, tan diverso del verdadero, en que se encuentran conservados generalmente los animales marinos que forman parte de las colecciones de estudio y de las existentes en los Museos.

Los primeros éxitos obtenidos, la gran abundancia de material y las facilidades que constantemente me ha proporcionado la Estación, me han llevado al deseo de perfeccionar y extender, cada vez más, los métodos que la experiencia me ha aconsejado.

Como ya más arriba ha dicho el Profesor Dohrn, he debido por mucho tiempo guardar una cierta reserva para hacer públicos los resultados que poco á poco he ido adquiriendo. Sin embargo, hace ya algunos años que los vengo comunicando á diversos oficiales de Marina con el objeto de que puedan aprovecharlos y formar en el curso de sus viajes colecciones zoológicas en buenas condiciones para ser estudiadas.

En algunas publicaciones se ha hablado de los métodos usados en la Estación zoológica; esto ha sido hecho sin ninguna autorización y aun sin nuestro conocimiento; por esta razón no asumo ninguna responsabilidad de las cosas que en tales trabajos se digan.

Los métodos que ahora publico, están destinados principal-

mente á conservar el aspecto general de los animales que han de figurar en los Museos ó han de servir en las lecciones de los cursos; así, pues, estos métodos no están destinados á las investigaciones histológicas; pero, sin embargo, en muchos casos la conservación de los elementos celulares queda conseguida al mismo tiempo que la de la forma del cuerpo.

Aun cuando estos métodos han sido experimentados solamente con los animales de este golfo, es claro que pueden ser aplicados con resultado, igualmente bueno, á las formas afines de otros mares, y así lo prueban las diversas colecciones formadas por los oficiales de Marina.

Espero, pues, que estas notas podrán ser útiles á todos los que se ocupan de la conservación de los animales marinos; pero no abrigo, en modo alguno, la pretensión de haber llegado á la perfección y haber agotado tema tan vasto. Únicamente he de decir, que los métodos aquí expuestos son solamente aquellos que con una larga práctica me han dado mejores resultados, y que en la mayoría de los casos presentan ventajas indiscutibles sobre todos los usados hasta hoy.

Nápoles, Marzo 1890.

A.—Utensilios y reactivos.

Todos los animales preparados, después de haber sufrido un tratamiento previo por diversos reactivos, se conservan definitivamente en el alcohol, dentro de recipientes de vidrio, cerrados con tapones de corcho ó de vidrio esmerilado; la forma más conveniente, y sin duda la más elegante, es la de los vasos cilíndricos de poca base, y con el tapón esmerilado y plano superiormente. Sirven, con las dimensiones que se deseen, mejor que ningún otro recipiente para conservar animales de cualquier forma que sean con gran economía de líquido.

Sin embargo, como el precio de estos recipientes es más elevado, para los usos ordinarios y para las manipulaciones, pueden también usarse los frascos ordinarios de cuello bajo y algo más estrecho.

Los frascos de poco tamaño, más bien bajos y con el tapón

excavado en su interior, se utilizan para los animales pequeños de forma globosa ó deprimida.

Los tubos de fondo esférico con los bordes redondeados al fuego y de paredes poco gruesas, son de gran utilidad. Los que poseen un calibre mayor de 30 mm. deben tener los bordes ligeramente vueltos hacia fuera con el objeto de poder sujetar en ellos fácilmente un pedazo de vejiga. Todos indistintamente se cierran con un tapón de corcho; éste debe ser más bien bajo y cilíndrico, para que se adapte bien á las paredes del tubo, y su cara inferior igualada por un corte que dé una superficie plana, con objeto de que no se desprendan pedacitos del corcho que enturbien el líquido. Se debe también tener cuidado de escoger los tapones bien compactos sin hendiduras ni agujeros.

Para la conservación de animales pequeños y de larvas, huevos, etc., es conveniente colocar los tubos pequeños que los contengan, tapados con algodón, en un recipiente con alcohol bien cerrado; así el alcohol contenido en los tubitos no se evapora y permanece siempre líquido, al paso que los cerrados con tapones de corcho, á la larga, colorean en pardo los ejemplares, por el ácido tánico que se desprende.

Para algunos animales de forma ensanchada y planos como los Astéridos, Pleuronéctidos y otros semejantes, se emplean recipientes de caras rectangulares, estrechos y más bien altos, los cuales, merced á un mastic cualquiera, se cierran con una lámina de vidrio. Estos recipientes tienen la ventaja de dejar observar mejor el objeto preparado.

Para las formas sutiles, alargadas y rígidas, como por ejemplo la *Funiculina*, suelo cortar, según la longitud necesaria, tubos de vidrio, cerrando una extremidad á la lámpara y la otra con un tapón de corcho.

En las manipulaciones preliminares se usan mucho los cristalizadores; pues teniendo el fondo plano y las paredes poco elevadas, pueden contener, con una cantidad de líquido pequeña, un gran número de ejemplares sin que se toquen ni se compriman. Sirven también para colocar los animales vivos en el agua del mar y dejarlos en reposo hasta que se extiendan, para después poderlos matar por los métodos rápidos ó lentos más adecuados y endurecerlos en diversos líquidos hasta que se transporten á su recipiente definitivo. Estos

cristalizadores tienen sus bordes esmerilados; de este modo pueden taparse con un disco de vidrio.

Para endurecer los gusanos ú otros animales de forma alargada, usamos vasos rectangulares, pequeños, cubiertos con una placa de vidrio.

No es preciso advertir que es necesario también el poseer una cantidad de vasos comunes sin pie, de diversas dimensiones, que pueden servir para contener los animales vivos; además, tubos de vidrio para cazar los animales pequeños, pipetas cuenta-gotas, cubetas de vidrio, frascos de cuello estrecho para los reactivos, embudos de vidrio de diversos tamaños, probetas graduadas, etc, etc.

Utensilios diversos.

Para conservar animales, y especialmente peces, de un tamaño superior al de los recipientes de vidrio mencionados, hemos hecho construir cajas de zinc rectangulares con un canal en los bordes, en el cual entra la tapa que tiene sus bordes también rebatidos, y se impide la evaporación llenando este canal de agua con una ligera capa de aceite por encima. La tapa tiene en el centro un agujero que se tapa con un corcho y sirve para dar paso al aire comprimido al cerrar. Estas cajas presentan, sin embargo, el inconveniente de que al cabo de cierto tiempo el zinc se corroe (probablemente por las sustancias ácidas que el alcohol extrae de los tejidos animales). La caja de metal se debe revestir con otra externa de madera para que no se estropee con los choques que pueda sufrir.

Además de las cubetas rectangulares de vidrio, usadas para los animales de forma prolongada, empleamos otras de zinc con una capa de cera en el fondo, sobre la cual se fijan con alfileres, bien extendidas las formas que se quieren preparar. Cuando se usen líquidos que ataquen los alfileres ordinarios (ácidos, sublimado, etc.), podrán estos substituirse con espinas de *Erinaceus* ó de *Cactos*.

Para pasar los objetos de uno á otro recipiente ó cambiar el líquido, se usan espátulas de diversos tamaños, preferiblemente de asta, puesto que no son atacadas por los diversos líquidos.

Una pinza grande de hierro ó latón es siempre muy cómoda para coger los animales de los recipientes profundos. Se tendrán también pinzas pequeñas, tijeras, bisturís de diversos tamaños y jeringuillas.

Para narcotizar las Actinias con el humo del tabaco, uso el siguiente aparato: al extremo de un fuelle pequeño se adapta la boca de una pipa de metal, llena de tabaco encendido; el tubo de esta pipa, encorvado en S, se introduce en el recipiente en que se halle el animal que se quiera narcotizar con el humo.

Reactivos.

El líquido más indispensable es sin duda ninguna el alcohol. El alcohol rectificado, limpio, que se mezcla con el agua destilada sin formar ningún precipitado, es el que se debe preferir para la preparación y conservación de las formas delicadas y transparentes, mientras que para las especies voluminosas puede emplearse el alcohol ordinario ó el que resulta de la destilación del alcohol ya usado, el cual se debe antes neutralizar, añadiéndole cal si es ácido, y ácido clorhídrico si es alcalino. Siempre tenemos dispuesta una cantidad de alcohol de 70°, que es el usado comunmente para conservar los animales; solo en algunos casos especiales se usa el alcohol de 90°. Antes de servirse del alcohol débil, recién preparado añadiendo agua, es preciso dejarlo reposar para evitar que el contenido en el agua, al desprenderse en pequeñas burbujas, se fije sobre el objeto preparado y lo eleve á la superficie del líquido.

Los animales fijados con un líquido cualquiera, se conservan siempre en alcohol; aquellos que son blandos y gelatinosos, se comienza por dejarlos de dos á seis horas en alcohol de 35 ó 50°, según su mayor ó menor consistencia, y después se pasan á alcohol de 60° ó bien directamente al de 70°.

Cuando estas manipulaciones puedan estropear la preparación, se cambia el alcohol quitando una porción del alcohol más débil en que el objeto se encuentre, y añadiendo alcohol más fuerte hasta llegar al grado deseado; y, para evitar sacudidas en el líquido, este cambio puede hacerse con sifones.

Para que los animales se puedan conservar definitivamente, es preciso que el alcohol de 70° se cambie después de pasadas

doce ó veinticuatro horas, y si el ejemplar es de alguna magnitud, otra vez después de dos días.

Las formas de regular consistencia se sumergen directamente en alcohol de 70°, que después se cambia según hemos dicho. Sucede á veces, aunque raramente, que aun después de tales cambios, el alcohol se altera al cabo de algún tiempo, y en este caso es preciso cambiarlo de nuevo.

Cuando se colocan en un recipiente animales aún no bien empapados en el alcohol, es necesario agitar el líquido, con objeto de evitar que en el fondo se forme una capa de alcohol muy débil, en la cual los animales pudieran sufrir una maceración.

He probado muchos líquidos que pudieran substituir al alcohol, pero los resultados siempre han sido malos. Los unos, como el líquido de Goadby y el de Owen, empleados anteriormente para la conservación de las formas gelatinosas, al cabo de algún tiempo las contraen y las deforman por completo. El líquido de Wickersheimer, tan preconizado en su tiempo, usado para los animales marinos, los deforma y los macera.

El alcohol de 70° es el preferible para conservar definitivamente los animales, siempre que estos, merced á repetidos cambios, se hallen perfectamente penetrados de él; el alcohol más fuerte, no solo es en la mayoría de los casos innecesario para la buena conservación de los objetos, sino que hasta resulta dañoso, puesto que endurece, al cabo del tiempo, los ejemplares y los vuelve demasiado frágiles.

Se usa también el alcohol para anestesiar y matar los animales lenta ó rápidamente.

Ácido crómico.—Después del alcohol, este ácido, en disolución acuosa, es uno de los más útiles reactivos, y sirve principalmente para matar y endurecer los animales gelatinosos y blandos. Los ejemplares deben permanecer poco tiempo en este ácido; de lo contrario se colorean demasiado y se hacen muy frágiles. Es preciso al momento, según es sabido de todos, lavar los pedazos en agua dulce para evitar que después de puestos en el alcohol produzcan un precipitado, y á la larga adquieran un color demasiado verdoso. También se usa el ácido crómico mezclado con los ácidos ósmico, acético, pícrico, con sublimado, y rara vez también con el alcohol. Las soluciones se pueden hacer en agua, aun cuando no sea desti-

lada, y excepcionalmente también en agua de mar. Es útil conservar estas disoluciones en sitios frescos. Las disoluciones que han sido una vez usadas, pueden ser utilizadas de nuevo, si no se han diluído mucho en el agua que contuviese los animales, y si de ello no ha pasado demasiado tiempo; por lo demás es fácil asegurarse de si aún pueden ser utilizadas, por su cambio de color, que tiende á pasar al verde.

Ácido acético.—Es un reactivo que tiene el poder de penetrar instantáneamente en los tejidos y fijarlos; es el medio más eficaz de matar rápidamente los animales contráctiles, pero tiene el inconveniente de ablandarlos si permanecen dentro de este líquido demasiado tiempo. Siempre quedan bastante transparentes. En ciertos casos es menester usar el ácido en soluciones concentradas, y á menudo se mezcla con el ácido crómico para matar y endurecer animales transparentes, no contráctiles.

Ácido ósmico.—En general no es hoy ya tan empleado como lo era anteriormente, puesto que presenta diversos inconvenientes. He estudiado el medio de sustituírlo por otros reactivos y en muchos casos lo he logrado por completo. Endurece bien las formas gelatinosas y aun conserva suficientemente su transparencia, pero á poco que se prolongue su acción ennegrece los objetos y los vuelve demasiado frágiles; por esta razón solo deben permanecer en este ácido hasta que hayan adquirido una ligera tinta parda (1). Antes de pasar los objetos al alcohol, se lavan algunos minutos en agua dulce ó destilada, y lo mismo se ha de hacer con los tratados por cualquier mezcla que contenga ácido ósmico.

El *líquido de Kleinenberg* (2) ha sido de los primeramente usados en la Estación para la conservación de las formas marinas. El inconveniente que presenta de teñir el alcohol de amarillo, aun después de numerosos lavados, y de no endurecer suficientemente, ha hecho que poco á poco se fuese aban-

---

(1) El método del Dr. P. Mayer para decolorar los objetos demasiado ennegrecidos (véase *Mitth. Z. Stat. Neap.* 2 Bd., 1880, pág. 8) no se puede aplicar á los animales de poca resistencia, pues quedarían demasiado reblandecidos.

(2) El líquido de Kleinenberg se hace de la siguiente manera: se mezclan 100 c. c. de una disolución acuosa concentrada de ácido pícrico con 2 c. c. de ácido sulfúrico concentrado; al líquido filtrado se le añade tres veces un volumen igual de agua destilada.

donando, tanto que hoy se usa rara vez y solo con un fin histológico.

Ácido láctico.—En solución de 1 por 100 en agua de mar, sirve bastante bien para fijar larvas y organismos pequeños gelatinosos.

Los *ácidos clorhídrico, nítrico, piroleñoso* y *sulfúrico* se usan rara vez.

Sublimado corrosivo.—Recomendado por A. Lang, se emplea muy á menudo como fijador, porque tiene la propiedad de penetrar rápidamente y endurecer bastante; se usa en soluciones concentradas, sea en agua dulce ó en agua de mar, y tanto en frío como en caliente. En las manipulaciones con el sublimado no se usarán instrumentos de metal, porque se estropean é inutilizan la preparación. Para economizar tiempo las disoluciones pueden también hacerse en caliente, valiéndose para ello de recipientes de vidrio ó de porcelana, teniendo cuidado de no hacerlas llegar á la ebullición, para no respirar los vapores, y de no tocar con las manos si se tienen en ellas heridas ó grietas.

Casi todos los animales preparados con este reactivo pueden servir también para investigaciones histológicas. También se usa á menudo mezclado con el ácido acético, el crómico ó el sulfato de cobre.

Los animales que hayan sido fijados por el sublimado, después de lavados con agua dulce, deben permanecer según ha sido indicado por P. Mayer, en el alcohol yodado hasta que ya no lo decoloren, aun permaneciendo algún tiempo; sin esta precaución la preparación se vuelve muy frágil, y se forma un precipitado negro que contiene mercurio y aun algunas veces ennegrece las paredes internas del recipiente.

Bicromato de potasa.—Se usa en disolución al 5 por 100, para endurecer lentamente algunos animales gelatinosos sin hacerlos demasiado frágiles, cosa que no se logra con el ácido crómico. Los objetos tratados con este líquido, al pasar al alcohol forman un abundante precipitado, razón por la cual el uso de este reactivo no es muy de recomendar. Para decolorar después las preparaciones, una vez ya en el alcohol, añado á este algunas gotas de ácido sulfúrico concentrado.

Sulfato de cobre.—Se usa en disoluciones del 5 al 10 por 100, hechas en caliente en agua dulce, y sirve solo ó mezclado con

el sublimado para matar las larvas y los animales delicados. Los objetos tratados por este reactivo deben después lavarse con agua repetidamente, hasta que esta no se enturbie; sin esto, se forman en los tejidos precipitados, que los hacen opacos. Este lavado puede abreviarse, cuando los ejemplares hayan de ser tratados por un ácido.

Hidrato de cloral (1).—En soluciones muy débiles al 1 ó 2 ⁰⁰/₀₀, hechas recientemente (en el momento) en agua de mar, lo usamos para narcotizar diversos animales, antes de fijarlos. Este método tiene la ventaja de que, si el animal al cabo de cierto tiempo no queda en las condiciones deseadas para ser preparado, se puede volver al agua de mar, donde recobrará el movimiento y continuará viviendo. También se usa para hacer salir, y después prepararlos, á los animales que viven entre las piedras, en las incrustaciones de algas calizas, en las colonias de Sérpulas y Madréporas, las cuales se dejan en la disolución de seis á doce horas.

Además de estos reactivos citados, se tendrán también pequeñas cantidades de cloroformo, éter y tintura alcohólica de yodo.

MEZCLAS MÁS EMPLEADAS.

Alcohol y ácido crómico.	Alcohol de 70°.....	partes iguales.
	Ácido crómico al 1 %.....	
Alcohol clorhídrico....	Alcohol de 50°.....	100 c.c.
	Ácido clorhídrico concentrado...	5 c.c.
Alcohol yodado.....	Alcohol de 35° ó de 70°.....	100 c.c.
	Tintura alcohólica de yodo.....	2,5 c.c.
Agua marina alcoholizada.....	Agua de mar.....	100 c.c.
	Alcohol absoluto.....	5 c.c.
Mezcla cromo-acética núm. 1.....	Ácido crómico al 1 %.....	100 c.c.
	Ácido acético concentrado.....	5 c.c.
Mezcla cromo-acética núm. 2.....	Ácido acético concentrado.....	100 c.c.
	Ácido crómico al 1 %.....	10 c.c.
Mezcla cromo-ósmica..	Ácido crómico al 1 %.....	100 c.c.
	Ácido ósmico al 1 %.....	2 c.c.
Mezcla cromo-pícrica...	Ácido crómico al 1 %.....	partes iguales.
	Líquido de Kleinenberg.....	

(1) Es inútil usar solo el hidrato de cloral de la mejor calidad.

Mezcla de caparrosa azul y sublimado....	Sulfato de cobre al 10 %.....	100 c.c.
	Sublimado á saturación.....	10 c.c.
Mezcla de bicromato potásico y ácido ósmico.	Bicromato de potasio al 5 %....	100 c.c.
	Ácido ósmico al 1 %.....	2 c.c.
Mezcla de sublimado y ácido acético.....	Sublimado, solución concentrada.	100 c.c.
	Ácido acético concentrado.....	50 c.c.
Mezcla de sublimado y ácido crómico.....	Sublimado, solución concentrada.	100 c.c.
	Ácido crómico al 1 %.....	50 c.c.

B.—Métodos de preparación y conservación.

Protozóos.

Siendo los protozóos animales muy pequeños y en su mayor parte invisibles sin el auxilio del microscopio, su preparación entra más bien en el campo de la micrografía, razón por la cual me he ocupado únicamente de las especies de mayor tamaño. Algunas Gregarinas se encuentran parásitas en el núcleo intestinal de la *Salpa maxima africana;* quedan bien preparadas con el líquido de *Kleinenberg*, dejándolas en él casi una hora y luego pasándolas al alcohol débil.

Radiolarios.—La *Thalassicolla* se fija muy bien con el ácido crómico al $^1/_2$ %, dejándola en él próximamente una hora y pasándola después por los alcoholes hasta el de 70°.

Los Aulacántidos y los Acantométridos se ponen directamente en alcohol á 50°, y después de algunas horas se pasan al de 70°. También se consiguen buenas preparaciones añadiendo al agua de mar que contenga estos animales algunas gotas de ácido ósmico al 1 % y lavándolos después en agua dulce antes de pasarlos al alcohol. De algunas especies fijadas, juntamente con otros organismos pelágicos, en una solución concentrada de sublimado en agua de mar obtuve buenísimas preparaciones microscópicas.

Esferozóidos (1).—Las diversas especies de los géneros *Spherozoum* y *Collozoum* que tienen forma esférica ó cilín-

(1) Estos métodos han sido descritos por K. Brandt, en su monografía *Die Kolonienbilden den Radiolarien (Sphærozoën) des Golfes von Neapel*, páginas 7-11, publicada en la «Fauna y Flora del Golfo de Nápoles», 13 Monogr., 1885.

drica, se fijan con el alcohol de 35°, yodado, dejándolas en él de quince minutos á una hora próximamente, y teniendo cuidado de agitar el líquido, pues de lo contrario, permaneciendo mucho tiempo sobre el fondo de la vasija, se deprimen y aplanan. Si se quiere preparar de una vez una gran cantidad, es menester poner el líquido en un cristalizador grande para que los ejemplares no se compriman los unos con los otros. Después del tiempo ya dicho se pasan al alcohol de 35°, en el cual han de permanecer un par de horas. El cambio de líquidos se puede hacer, ó bien pasando los ejemplares con una espátula á otro cristalizador del mismo tamaño, ó también quitando lentamente el alcohol yodado y sustituyéndolo con alcohol de 35°, pero sin dejarlos jamás sin líquido. De la misma manera se pasan al alcohol de 50°, y al cabo de 12 horas al de 70°, que debe también ser renovado veinticuatro horas después. De este modo se obtienen ejemplares incoloros que pueden servir también para investigaciones histológicas. No se debe recomendar el ácido ósmico, porque las ennegrece demasiado.

En las colonias de *Sphærozoum* con formaciones isospóricas no se usa para fijarlas el alcohol yodado, sino que es preciso emplear el sublimado concentrado. Los géneros *Myxosphæra*, *Acrosphæra* y *Collosphæra* se matan con el ácido crómico al 1 %, usando la misma forma de recipiente y las mismas precauciones que para el *Collozoum:* se dejan en este líquido de media á una hora, y después, vertiendo el ácido, se sustituye por agua dulce para lavar el preparado, pero haciendo que las colonias floten en el líquido, pues de otro modo se romperían; de la misma manera se pasan gradualmente por los diversos alcoholes.

Acinétidos.—La *Tricophrya salparum* ha dado buenas preparaciones microscópicas con el sublimado concentrado en agua de mar. Por el contrario, para la *Acineta fœtida*, que se encuentra frecuentemente entre los hidroidéos, es menester emplear el ácido ósmico.

Vorticélidos.—Las colonias de *Zoothamnium* se matan mejor con el sublimado concentrado hirviendo.

Poríferos.

Para las esponjas destinadas á ser conservadas en colección basta la inmersión directa en alcohol de 70°, renovándolo como se ha dicho anteriormente.

Para evitar la contracción en las *Halisarcidas*, las fijo en ácido crómico al 1 %, dejándolas en él media hora, ó bien en el sublimado concentrado 15 minutos. Las esponjas destinadas á ser estudiadas, si no son demasiado voluminosas, es decir, si no tienen un espesor mayor de 10 cm., se sumergen en alcohol de 90° ó absoluto, renovándolo primeramente después de tres á cuatro horas, y luego una segunda vez al cabo de veinticuatro á cuarenta y ocho; si son muy grandes, con un cuchillo bien afilado se cortan pedazos, y se tratan de la misma manera.

Para hacerlas secar, se lavan primero en agua dulce durante un par de horas, después se dejan todo un día en alcohol ordinario, y finalmente, se ponen al aire y al sol; de este modo no conservan mal olor. Si se desea mantener durante algunos días el color rojo de algunas esponjas *(Suberites, Axinella)*, basta ponerlas en alcohol de 40°, sin cambiarlo.

Celentéreos.

Antozóos.

Lo primero que ha de hacerse cuando se ha pescado un antozóo, es ponerle en un recipiente con agua fresca de mar. Sucede siempre que los animales molestados por el aparejo al ser pescados ó durante el transporte, se contraen ó se ocultan por completo; para hacerlos extenderse, basta dejarlos en una vasija con agua de mar limpia, ó á veces es necesario tenerlos durante cierto tiempo en agua corriente. A menudo he observado que muchos se abren solamente después de algunos días de permanencia en la misma agua y cuando esta empieza á corromperse.

Los siguientes métodos, especialmente en los que se emplea

la mezcla cromo-acética núm. 2, se emplean para conservar los animales destinados á los Museos ó cuando más para el estudio de la anatomía macroscópica.

Casi todos los *Alcionarios* contienen pequeñas espículas calizas que se deben conservar en los tejidos, pues son caracteres específicos; por esta razón deben permanecer poco tiempo en la mezcla ácida con objeto de evitar el que esta destruya las espículas.

En los casos en que la mezcla cromo-acética, núm. 2, no dé buenos resultados, puede emplearse en su lugar la mezcla de sublimado y ácido acético, pero únicamente para matar los animales, transportándolos después al alcohol débil.

Un método usado por *G. v. Koch* es la inmersión rápida de los animales en alcohol de 90° ó absoluto (1), inyectándolo también en el interior de la colonia.

Tan pronto como las colonias de *Cornularia*, *Clavularia*, *Rhizoxenia* y *Sympodium* están extendidas, con un sifón se extrae toda el agua de mar del recipiente, dejando solo la cantidad precisa para cubrir la colonia. Esta operación ha de hacerse con mucho cuidado, y hay que evitar cualquiera sacudida que pueda hacer que los pólipos se contraigan; para esto se mete en el vaso el sifón ya lleno de agua, teniendo la abertura inferior tapada con el dedo, para poder regular la corriente de agua. Después se vierte rápidamente en el recipiente un volumen de la mezcla cromo-acética, núm. 2, doble del de agua en la cual están los animales, los cuales inmediatamente después se pasan á alcohol de 35° ó 50°, agitando un poco el recipiente que contiene el preparado para hacer que los tentáculos se extiendan mejor. Otro método bueno consiste en matar con el sublimado concentrado, caliente, usado en la misma proporción que la mezcla cromo-acética y lavar los animales, apenas muertos, en agua dulce.

Los grandes ejemplares de *Alcyonum* se pueden también

---

(1) En el Museo de Ciencias naturales de Madrid y en la Estación de Biología marina de Santander se conservan varios ejemplares de *Veretillum Cynomorium* con sus pólipos completamente extendidos, que preparó ya de esta manera en Abril de 1883, al explorar la fauna de animales inferiores del golfo de Valencia, el Prof. González de Linares, á quien no pareció entonces ni después, hasta ahora, digno de publicarse el resultado por él obtenido con semejante procedimiento, porque no le resultó eficaz siempre, sino bastante fortuito.

matar de otra manera, sumergiéndolos rápidamente en el ácido cromo-acético, núm. 2, y suspendiéndolos apenas muertos en un vaso con alcohol débil, de modo que los pólipos no toquen con las paredes del recipiente, y si los pólipos han quedado bien extendidos, el cambio de alcoholes se hará muy gradualmente. A menudo sucede que en el alcohol débil se forman burbujas de aire, que se adhieren á los pólipos y por su tendencia á flotar los comprimen hasta casi deformarlos; esto se puede evitar dando golpecitos al recipiente para hacer que se desprendan las burbujas.

Pennatula phosphorea y *Kophobelemnon*.—Los animales, una vez bien extendidos, se cogen por la base desnuda y rápidamente se sumergen en un vaso cilíndrico, profundo, que contiene la mezcla cromo-acética, núm. 2; después de algunos segundos se ponen en un cristalizador en alcohol débil á 50°, donde se colocan con el dorso tocando el fondo. Entonces con una geringuilla de cánula delgada se inyecta alcohol de 70° por un agujero pequeño que se practica en el extremo de la base; de este modo el alcohol penetra en todos los pólipos, los hincha y extiende sus tentáculos; luego, para evitar que el alcohol se marche, se liga por la base el ejemplar. Después de algunas horas se pasan al alcohol de 70°, y en los recipientes definitivos el *Kophobelemnon* se suspende por la base, por un flotador de vidrio.

Pennatula rubra, *Pteroides spinulosus*, *Veretillum*, *Funiculina*.—Se matan como los Pennatúlidos precedentes, pero después se pasan al alcohol débil sin practicar la inyección: las formas blandas, como el *Veretillum*, deben quedar suspendidas en el recipiente definitivo.

Los ejemplares pequeños de Pennatúlidos se pueden matar sin sacarlos del vaso en que estén bien extendidos, tratándolos como á la *Cornularia*.

Las ramificaciones de cierto tamaño de *Gorgonia*, *Gorgonella*, *Primnoa*, *Muricea*, *Isis*, etc., se deben matar con la mezcla cromo-acética, núm. 2, en el mismo recipiente en que estén bien extendidas, á causa de la extremada sensibilidad de sus pólipos. Se recomienda siempre dejar en el momento en que se han de matar los animales la menor cantidad posible de agua y verter en ella un volumen de la mezcla, doble, al menos, de la cantidad de agua en la que los animales estén

contenidos. Diversas veces he podido observar que los gorgónidos que se extienden en el agua de mar cuando esta empieza á descomponerse, son los que mejor se fijan.

Las colonias pequeñas ó trozos de colonia que queden con los pólipos extendidos se pueden matar con el sublimado concentrado hirviente.

El *Isis* se conserva muy bien á su vez, con la mezcla de sublimado y ácido acético.

Corallium rubrum.—Extendido en el agua de mar corriente, se mata con el sublimado concentrado hirviendo (mitad del volumen del agua de mar), y al momento se pasa al alcohol débil. Con este método el color se conserva perfectamente mientras que con la mezcla cromo-acética siempre baja mucho. El alcohol que haya servido para la manipulación del coral, no debe usarse para la preparación de otros animales delicados. (Una colonia de *Antipathes*, puesta en dicho alcohol, á las veinticuatro horas estaba teñida de rojo.)

Zoantharios.—Todas las especies de *Antipathes* se fijan con el sublimado concentrado, y por la poca contractilidad de de los pólipos suele siempre obtenerse buen resultado. El sublimado concentrado se usa en frío, empleando una cantidad igual al volumen de agua en que estén contenidos los pólipos.

Actiniarios.—La preparación de este grupo presenta muchas dificultades; la gran contractilidad y la resistencia del sistema muscular de la mayor parte de las especies constituyen á menudo para el preparador un obstáculo insuperable. Las más de las veces, cuando se cree que el animal está ya narcotizado y privado de toda sensibilidad, basta la inmersión en un reactivo de acción rápida para ver de pronto contraerse los tentáculos y hacerse todo el cuerpo irrecognoscible.

De algunas formas, por ejemplo, tratando diversos ejemplares por el mismo método y en las mismas condiciones, una parte muere bien extendida y la otra en estado de contracción; el éxito, pues, depende en algunos casos de razones que hasta ahora son del todo desconocidas. A pesar de esto, poniendo gran cuidado, al menos para muchas especies, se llega á conservarlas perfectamente.

La *Anemonia sulcata (Anthea cereus)* es la más fácil de preparar. Bien extendida en el agua corriente, se mata con la mezcla cromo-pícrica (en volumen igual al del agua en que

se encuentra) vertiendo este rápidamente en el recipiente que contiene la actinia, después de quitar toda la cantidad posible de agua, pero quedando sumergido el animal. Después de cinco ó diez minutos, muerto el animal, se separa su base de la pared á que estuviera fija, y entonces se pasa este á otro recipiente que contenga ácido crómico al $^1/_2$ $^0/_0$, donde se suspende invertido, del margen de la base con uno ó más ganchos, y se trata, removiendo un poco el líquido, de dar á los tentáculos su posición natural. Después de media hora se pasa al alcohol débil y es conveniente que luego en el recipiente definitivo se mantenga siempre invertido, á no ser que se trate de ejemplares pequeños.

Para las siguientes especies uso, al matarlas, el sublimado concentrado hirviendo: *Eloactis*, *Sagartia Dohrnii*, *Paranthus*, *Corynactis* y pequeños ejemplares de *Aiptasia;* antes de pasarlos al alcohol, los dejó endurecer algunos minutos en ácido crómico al $^1/_2$ $^0/_0$.

Cuando el *Heleactis bellis*, el *Bunodes gemmaceus* y el *B. rigidus* están bien extendidos, se quitan del vaso $^2/_3$ del agua de mar y se sustituyen con hidrato de cloral al 2 por $^{00}/_{00}$. Después de un par de minutos se quita de nuevo el líquido, dejando apenas lo preciso para cubrir el animal, y se mata vertiendo sublimado concentrado frío.

La *Adamsia Rondeletii* se narcotiza con el humo de tabaco (1), de la manera siguiente:

Se saca de la concha en que está fija la actinia, el *Pagurus*, para evitar que la moleste y haga cerrar; después se suspende la concha, por medio de un hilo, de una varita de madera que se apoya sobre los bordes de un vaso que contiene agua de mar, y que sea bastante capaz para poder contener la actinia en expansión, de modo que no toque con las paredes del vaso. Estos vasos así dispuestos se colocan, todos los que quepan, en un cristalizador grande ó en un plato de vidrio de paredes bajas, lleno hasta la mitad de agua, y el todo se cubre con una campana de vidrio cuyos bordes queden sumergidos en el agua. Con el aparato ya descrito (pág. 281) se comienza á

(1) Los hermanos Hertwig, que publicaron este método, lo han visto en el laboratorio de esta Estación zoológica, como ellos mismos dicen. (Véase *Jena. Zeit. f. Natur.* 13 Bd., 1879, pág. 467.)

llenar con humo de tabaco, que debe ser de cualidad muy fuerte, el espacio vacío que queda debajo de la campana, y se suspende la operación solamente cuando este está lleno de una densa nube de humo, que impide ver á través. Para hacer salir de la campana el aire que entra con el humo, antes de comenzar la fumigación, se pone un tubo doblado en U, uno de cuyos extremos penetre en el espacio cerrado y el otro quede fuera.

Para regular la duración de la operación es necesario hacer la primera fumigación hacia las dos de la tarde. Poco á poco se verá disiparse el humo, el agua comenzará á absorber las sustancias narcóticas contenidas en él y los animales, en su mayor parte extenderán su corona de tentáculos. Hacia las cinco de la tarde se hará la segunda fumigación parecida á la primera y se deja así dispuesto durante toda la noche. A la mañana siguiente, se levanta con cuidado la campana de vidrio y con una aguja se tocan los tentáculos para ver en qué estado de sensibilidad se encuentran; si bajo este estímulo no se contraen, se pone entre los vasos un tubo que contenga algunos centímetros cúbicos de cloroformo y se vuelve á tapar con la campana, para dejar obrar durante dos ó tres horas los vapores de cloroformo. Finalmente los animales se matan con la mezcla cromo-acética núm. 2, se endurecen con ácido crómico al $^1/_2$ por 100 y luego en alcohol, en el cual deben quedar suspendidos. Si, por el contrario, al ser tocados los tentáculos, hubieran dado signos de alguna sensibilidad, se hace una tercera fumigación y después de un par de horas los animales se tratarán de la manera ya dicha. Solamente así es como he podido obtener bellísimos ejemplares, con la columna bien extendida y el disco y los tentáculos en plena expansión.

La *Adamsia palliata* se puede tratar de esta misma manera, pero sin suspender la concha; he obtenido buen resultado, narcotizando lentamente el animal con agua de mar alcoholizada y después matándolo con la mezcla cromo-acética número 2 ó con el sublimado concentrado caliente.

La *Cladactis*, la *Cereactis* y la pequeña *Bunodeopsis strumosa* se hacen morir con la mezcla cromo-acética, núm. 2, y después se endurecen con el ácido crómico al 1 $^0/_0$, suspendiéndolas con un ganchito de vidrio que se clava en el margen de la

base y sumergiéndolas invertidas en los líquidos endurecedor y conservador. Esto no es necesario para la *Bunodeopsis*. Para las dos primeras formas es menester que los animales estén completamente enteros; en los que tengan lesiones ó roturas, al pasarlos al alcohol, sale por ellas todo el líquido contenido dentro del animal y este queda contraído é irrecognoscible. Los *Cerianthus* grandes se fijan con ácido acético concentrado y al momento después atándolos con un hilo alrededor de la base de la columna, se dejan suspendidos en alcohol débil, agitándolo un poco para que queden los tentáculos bien dispuestos; para los ejemplares pequeños no es preciso colocarlos suspendidos.

La *Actinia equina* y la *A. Cari* se tratan por la mezcla hirviente de sublimado y ácido acético, y luego por el ácido crómico al $^1/_2$ $^0/_0$ para endurecerlas. Frecuentemente he podido conservar la primera especie, sacándola con cuidado del vaso, en que estaba bien extendida con una espátula, y sumergiéndola en una solución concentrada de sublimado.

La *Edwarsia* se narcotiza lentamente vertiendo poco á poco alcohol de 70° en el agua de mar en que se encuentra y se mata después con sublimado concentrado caliente. El buen éxito depende de la completa pérdida de sensibilidad, cosa que se puede comprobar tocando los tentáculos con un alfiler.

La preparación de algunas especies de *Polythoa* es por extremo difícil; con los reactivos de acción rápida se obtiene al menos la columna bien extendida y algunos tentáculos fuera del disco. Una *Polythoa* que vive sobre las esponjas y sobre las algas calizas, probablemente una variedad de la *P. axinellæ*, se prepara muy bien con el sublimado concentrado hirviendo.

Las larvas de *Actinia*, se matan con el sublimado concentrado ó con la mezcla cromo-acética núm. 2.

Madreporarios.—El *Astroides calicularis* se deja toda una noche en un vaso con agua de mar limpia; ordinariamente á la mañana siguiente se encuentran los pólipos en plena expansión; entonces se quita parte del agua, sin que queden los pólipos descubiertos, y se mata con una solución hirviente de sublimado y ácido acético en volumen igual al del agua de mar. Inmediatamente después se transporta la colonia al alcohol á 35°, del cual, además, se hará una inyección por la

boca á cada pólipo para mantenerlos bien extendidos; luego se aumenta gradualmente la fuerza del alcohol, y repitiendo la inyección, se pasan, finalmente, al alcohol de 70°, donde se los lava bien con la tintura de yodo.

Las *Caryophyllia*, *Dendrophyllia* y *Cladocora* se fijan con el sublimado concentrado hirviendo; pero es muy difícil prepararlas con los pólipos en perfecta expansión, tanto á causa de su gran contractilidad, como de la delicadeza extrema de las paredes de su cuerpo.

Hidromedusas.

Las Hidromedusas son formas que en general mueren y se descomponen con mucha facilidad; por esto es necesario que se proceda á su preparación lo más pronto posible después que hayan sido pescadas.

Especialmente algunos Campanuláridos, como por ejemplo, *Aglaophenia*, *Plumularia*, *Sertularia* y otros parecidos, que viven por lo general en aguas profundas, llegan casi siempre al laboratorio estropeados ó muertos, y se estropean con más facilidad que otras formas con la draga, las redes de fondo ó cualquier otro instrumento de pesca. Lo mejor que se puede hacer entonces con estos ejemplares es meterlos en alcohol, para poder al menos conservar el perisarco.

Otras formas que viven á poca profundidad y que se pueden pescar, usando grandes precauciones para no maltratarlas, es preciso prepararlas al momento; de lo contrario, los pólipos se retraen al poco tiempo y no es ya posible hacerlos salir de su celda. En general estas formas son más contráctiles que los Tubuláridos.

Todos los Hidroideos, es decir, las formas polipoides fijas, salvo muy raras excepciones, se matan con el sublimado concentrado caliente, mientras que los pólipos están en completa expansión, lo cual se consigue poniéndolos, apenas recibidos, en vasos con agua de mar fresca. Al momento de haber vertido el líquido fijador sobre los animales, se vierte el todo en un cristalizador que contenga agua dulce, para enfriarlos, y de allí los animales se pasan á agua dulce para lavarlos, y cinco minutos después al alcohol débil; si se quie-

re evitar que se calienten demasiado, se puede usar el sublimado concentrado frío, pero solamente para los Tubuláridos.

Para las grandes colonias de *Tubularia* y *Pennaria* se puede emplear, para matarlas, la mezcla de sublimado y ácido crómico en un volumen igual al del agua de mar que contenga los pólipos; después de pocos minutos se pasan al alcohol.

Medusas de Tubuláridos.—Las formas pequeñas de *Eleutheria (Clavatella)*, *Cladonema*, *Podocoryne* y otras semejantes, se matan con la mezcla de sublimado y ácido acético, usando en gran cantidad; la *Eleutheria* se fija también satisfactoriamente con el líquido de *Kleinenberg*.

La *Lizzia Koellikeri* y la *Oceania pileata*, apenas han extendido bien los tentáculos, se matan con el ácido acético concentrado y al momento se hacen pasar á un tubo que contenga alcohol y ácido crómico; agitando lentamente el líquido, el animal recobra su forma; en esta mezcla permanece unos quince minutos y de ella se pasa al alcohol de 35°, que gradualmente se eleva hasta 70°. En vez del alcohol y del ácido crómico se puede tomar como líquido endurecedor la mezcla cromo-ósmica, pero los animales no quedan tan transparentes y los tentáculos se contraen un tanto.

El endurecimiento, sobre todo si las medusas que se han de preparar son muchas, se hará teniendo el tubo en posición horizontal, de modo que el disco apoye en las paredes laterales del tubo y los individuos no se toquen entre sí. Para la conservación definitiva de algunas medusas *(Lizzia)* acostumbro á poner cada una sola en un tubito con alcohol, tapado con algodón en rama. (V. más arriba, pág. 279.)

La *Oceania conica* y la *Tiara pileata*, antes de tratarlas como á la *Lizzia*, etc., se narcotizan en agua de mar alcoholizada al 3 por 100.

Medusas de Campanuláridos.—Eucope, *Gastroblasta* y *Obelia* se fijan con la mezcla de sulfato de cobre y sublimado; después de un par de minutos se lavan en agua dulce hasta que desaparezca toda traza de precipitado.

Mitrocoma y *Æquorea* se matan con el ácido acético é inmediatamente después se pasan á la mezcla cromo-ósmica, en la que se dejan de quince á treinta minutos, según el tamaño

del animal. Las *Æquorea* pequeñas se pueden fijar directamente con la mezcla cromo-ósmica.

La *Tima flavilabris* se mata con ácido crómico, al 5 por 100, que se vierte en volumen igual al del agua que contiene el animal; pasados cinco minutos se trata por la mezcla cromo-ósmica, en la cual permanece al menos una media hora; después se lava bien en agua dulce y se pasa gradualmente al alcohol.

Olindias Mülleri.—Se fija con el ácido acético, inmediatamente se pasa al ácido crómico al 1 %, donde con una pinza se extienden los tentáculos marginales.

Traquimedusas.—Rhopalonema, Cunina, Æginetа, Æginopsis, Liriope y Carmarina.—Se fijan con el líquido cromo-ósmico durante 5-20 minutos, según su magnitud, después se lavan en agua dulce y se pasan gradualmente al alcohol. La *Cunina* la mayoría de las veces da mejores resultados matándola con el ácido acético concentrado y endureciéndola después con la mezcla cromo-ósmica.

Para impedir que las campanas de las hidromedusas de gran tamaño *(Carmarina, Tima)* se aplanen y deformen, es necesario colocar en el fondo del recipiente en que se endurecen un vidrio de reloj cóncavo, sobre el cual se hará descansar la medusa invertida.

Acalefos.

La *Charybdæa* se fija rápidamente con la mezcla cromo-acética núm. 2, y al momento se trata por el ácido crómico al ½ %; pasada una media hora, al pasarla al alcohol, se tiene cuidado de suspenderla de los tentáculos.

La *Nausithœ*, la *efira* de *Pelagia* y el *Rhizostoma* se matan añadiendo al agua de mar en que nadan, el 3 % de una solución de ácido ósmico al 1 %, y apenas comienzan á tomar una ligera tinta parda, se lavan con agua dulce durante un par de minutos y luego se ponen en alcohol á 35°. Para evitar que se aplane el disco del *Rhizostoma*, se matará en un bocal de cuello algo estrecho, y cuando el animal se encuentre en alcohol, se quita el tapón y se cierra la boca con un pedazo de vejiga, de tal modo que, invirtiendo el bocal con

la medusa, el margen de la campana apoye sobre la orilla del cuello del recipiente, mientras que la parte convexa quede libre en el hueco del cuello. La medusa permanecerá en esta posición hasta que se haya elevado hasta 70 por 100 el grado del alcohol y todo su cuerpo esté impregnado de este líquido.

Pelagia noctiluca.—Se deja en líquido cromo-ósmico durante casi una hora, después se lava con agua dulce; estando en ella, se pasa un hilo alrededor del extremo de cada tentáculo, sin estropearlo, y cuando se ha pasado el animal al alcohol débil, se suspende de modo que la campana no toque con el fondo plano del recipiente; de esta manera permanecerá hasta que se endurezca por completo.

Cotylorhiza tuberculata (Cassiopeia).—Se fija con el ácido ósmico como el *Rhizostoma*, y en cuanto apenas comienza á tomar una ligera tinta parda, el líquido se sustituye con bicromato de potasa al 5 %, el cual se renueva dos días después; en este reactivo el animal debe permanecer dos semanas; pero se le puede dejar aún más tiempo sin que por ello se deteriore. Después el alcohol de 35° sustituírá al bicromato, y como se habrán formado un gran número de cristales en los tejidos del animal y se habrá además depositado un gran precipitado en el fondo del recipiente, es necesario renovar á menudo el alcohol, al cual se pueden añadir al principio algunas gotas de ácido sulfúrico concentrado.

Las larvas de Acalefos *(escifistoma* y *estróbilo)* se matan con el sublimado concentrado caliente; el *estróbilo* se fija también, con buen resultado, con una mezcla de ácido acético concentrado (9 partes) y ácido ósmico al 1 % (1 parte); inmediatamente después se lava con agua dulce.

Sifonóforos.

Como con las Hidromedusas, su preparación debe hacerse recién pescados y escogiendo los ejemplares que estén en mejor estado. Especialmente para los Fisofóridos, basta muchas veces que permanezcan un par de horas en el mismo recipiente y que el agua sufra un cambio de temperatura para que toda la colonia se rompa en pedazos ó se vuelva tan frágil que lo haga apenas la toque el líquido fijador. También

se debe tener gran cuidado de limpiar escrupulosamente los recipientes que contengan estos animales antes de matarlos; he podido muchas veces observar que basta la más ligera huella de un ácido ó de otro reactivo para disociar la colonia.

La *Athorybia rosacea*, único representante de la familia de los Atoríbidos que se encuentra en el Golfo, es muy rara, y solamente con un ejemplar he podido ensayar la preparación, matándole con la mezcla de sulfato de cobre y sublimado; el animal se contrae algo, pero queda entero; lo lavé con agua dulce y después lo puse en el alcohol.

Para las especies muy delicadas (Fisofóridos, Agálmidos) es conveniente no verter directamente los animales con el agua del recipiente en que han sido pescados, en el cristalizador en que hayan de ser muertos, sino pasarlos con mucho ciudado, sumergiendo los dos recipientes en un gran barreño con agua. En el cristalizador se dejará la cantidad de agua necesaria para que los animales floten y se esperará un poco á que extiendan bien sus pólipos é hilos pescadores.

Los géneros *Physophora*, *Agalma*, *Halistemma*, *Forskalia*, se matan con la mezcla de sulfato de cobre y sublimado (1), en volumen igual ó doble del agua de mar que contiene el cristalizador; la mezcla debe verterse rápidamente y no sobre los animales, los cuales, á los pocos minutos, una vez ya muertos, con una espátula ancha de cuerno se pasan al líquido endurecedor, que no es el mismo para todas las especies.

a) La *Physophora*, la *Agalma* y la *Halistemma*, se endurecen directamente en alcohol de 35°, y después de casi un par de horas se pasan al de 70°. Apenas la *Physophora* ha pasado al alcohol de 35°, antes que los hilos pescadores se pongan rígidos, se extienden con una pinza todo lo posible. Para cambiar el líquido contenido en las campanas natatorias se inyecta el alcohol con una pipeta por la apertura de cada una. Casi siempre se forman en las campanas burbujas de aire,

---

(1) He usado por primera vez este método en el año 1885, como resulta de una nota del Prof. Leuckart, inserta en el *Zoolog. Anzeiger*, tomo VIII, pág. 333, sin que nadie después lo haya vuelto á mencionar sino recientemente el Dr. M. Bedot, que ha descrito un método muy parecido. (*Arch. Sc. Physiq. Nat. Genève.* Tomo XXI, 1889, pág. 556.)

que por su tendencia á subir, pueden deformar las campanas, ó, levantando toda la colonia, aplastarla contra la superficie del líquido. Para hacer salir estas burbujas basta comprimir ligeramente las campanas.

b) El género *Forskalia*, de la mezcla de sulfato de cobre y sublimado, se pasa al líquido de Flemming (1), en el cual puede permanecer de dos á seis horas, según las dimensiones de la colonia, lavándola después algunas horas en agua dulce y pasándola gradualmente por el alcohol hasta el de 70°. El endurecimiento de las grandes colonias es mejor hacerlo con la mezcla de bicromato potásico y ácido ósmico, porque en él se pueden dejar hasta veinticuatro horas sin que se endurezcan demasiado; pero como el bicromato deposita cristales en los tejidos haciéndolos opacos, cuando el animal se pasa al alcohol, se pueden añadir á éste algunas gotas de ácido sulfúrico concentrado que disuelve los cristales; después la colonia se puede ya pasar al alcohol puro.

Para conservar definitivamente los Fisofóridos, una vez ya endurecidos por el alcohol de 70° en los cristalizadores durante un par de días, se pasan á un tubo, presentando la abertura al extremo anterior de la colonia y haciendo penetrar dentro el animal con el líquido que le contiene. Las *Agalma* y *Halistemma* de pequeñas dimensiones pueden sacarse del alcohol con una pinza, cogiéndolas por la extremidad posterior de la colonia y haciéndolas entrar con las campanas delante en un tubo lleno de alcohol de 70°, el cual debe ser de un calibre tal que no permita que el animal se pliegue sobre sí mismo; el tubo se tapa con algodón, y para evitar la evaporación se mete dentro de otro de mayor calibre, lleno de alcohol, que se tapa como de ordinario con el tapón de corcho. Este sistema del doble tubo evita los movimientos que hace el líquido en un recipiente incompletamente lleno, y es utilísimo para la expedición de los ejemplares y para hacer ver el preparado; por esto lo aconsejo para todos los animales muy delicados ó que tengan apéndices que se puedan desprender con facilidad.

Apolemia uvaria.—Se mata, como las precedentes especies,

---

(1) Acido crómico al 1 % 25 c. c.; ácido ósmico al 1 % 10 c. c ; ácido acético glacial, 5 c. c. Agua destilada, 60 c. c.

y se endurece con ácido crómico al 1 %, que en el mismo recipiente se va sustituyendo por medio de un sifón á la mezcla de sublimado y sulfato de cobre. Se deja en el ácido una veintena de minutos, se lava después con agua dulce, y esta por medio de un sifón se reemplaza con alcohol.

Rhizophysa.—Se deja extender bien en un vaso con un poco de agua y luego se mata con el sublimado concentrado en caliente; se lava al momento y se pasa al alcohol débil, en el que se arreglan y colocan bien en lo posible los tentáculos é hilos pescadores que se hayan agrupado durante la manipulación.

Physalia caravella.—Con objeto de hacer que los tentáculos y los pólipos se extiendan bien, se coloca en un recipiente cilíndrico con agua de mar bien transparente, teniendo cuidado de cogerla por el pneumatóforo, con objeto de evitar la acción urticante. La preparación sale mejor cuanto más alto sea el cilindro, porque los hilos pescadores se pueden extender mucho. Cuando el animal está ya bien extendido, se mata vertiendo sobre él la mezcla de sublimado y ácido acético (¼ del volumen del agua de mar), y apenas bien muerto, de la misma manera que se pasó primeramente, se transporta á otro recipiente igual que contenga ácido crómico al ½ %, y después de cerca de veinte minutos al alcohol de 50° y finalmente al de 70°.

Hippopodius, Galeolaria, Abyla.—Mátanse con la mezcla de cobre y sublimado, y después se pasan directamente al alcohol débil. La campana de la *Abyla* se prepara también con el líquido cromo-ósmico.

La *Praya* se fija como el *Hippopodius*, pero después se endurece con la mezcla del bicromato de potasio y ácido ósmico, dejándola permanecer en ella uno ó dos días.

Diphyes.—Sublimado en caliente para matarla con la cadena de individuos bien extendida.

La *Velella* se mata con la mezcla cromo-pícrica ó con la de sublimado y ácido crómico, y pocos minutos después se pasará al alcohol débil. La *Porpita* se envenena lentamente, haciendo caer con una pipeta algunas gotas de líquido de Kleinenberg, en el vaso donde esté extendida; y en cuanto el hermoso color azul de la colonia comienza á volverse rojo por el efecto del ácido, se pasa al líquido de Kleinenberg, en el que se dejará quince minutos para pasarla luego al alcohol débil

Ctenóforos.

Beroe ovata, Hormiphora, Callianira, Lampetia, Euchlora, y las formas jóvenes de *Cestus. Eucharis* y *Bolina* se matan haciéndolas caer en la mezcla cromo-ósmica, en la que se dejan de quince á sesenta minutos según su tamaño; después se pasan al alcohol, que gradualmente se eleva hasta 70°.

La *B. ovata* se endurece en el alcohol, haciendo entrar en la cavidad gástrica la boca de un tubo de vidrio bastante grande para mantenerla extendida; la *Beroe* quedará suspendida en el líquido, dejando en el tubo puesto boca abajo la cantidad de aire necesaria para hacerla flotar; esta operación debe hacerse con gran cuidado para no estropear la serie longitudinal de paletas vibrátiles. Después de estar uno ó dos días en alcohol á 70°, se quita el tubo y el animal queda endurecido conservando su forma.

La *Beroe Forskalii*, que es naturalmente comprimida, para hacerla morir en estado de expansión es menester tratarla por la mezcla de sulfato de cobre y sublimado, y apenas muerta, endurecerla con el líquido cromo-ósmico, al menos durante una hora. Para esta especie no es necesario introducir el tubo.

La *Callianira*, además del método ya dicho, puede también prepararse fijándola con una mezcla compuesta de:

Ácido piroleñoso concentrado.....	1 vol.
Sublimado concentrado.....	2 »
Ácido crómico ½ %.....	1 »

Cestus Veneris.—El animal se deja en poca agua y se vierte sobre él rápidamente la mezcla cromo-acética, núm. 1, hasta que llene las tres cuartas partes del vaso; entonces se le coloca arrollado en espiral, haciéndole que apoye del lado opuesto á la boca sobre el fondo. A los diez minutos se lavará con agua dulce, y con mucho cuidado se irá cambiando sucesivamente el alcohol. Los ejemplares que se quieran preparar han de estar en las mejores condiciones; de otro modo se hincharán en los líquidos fijos. Con la mezcla cromo-ósmica pueden también fijarse bastante bien, pero muchos ejemplares se estropean y quedan demasiado coloreados, mientras que con el método precedente quedan blancos y bastante transparentes.

Equinodermos.

Crinoidéos.—La *Antedon rosacea (Commatula)* se sumerge directamente en alcohol de 70°, mientras que la *A. phalangium* se rompería en pedazos en este alcohol, razón por la cual es preciso tratarla por el de 90°.

Las formas larvales pentacrinoides se narcotizan con hidrato de cloral al 1 por 100, dejándolas permanecer de dos á cuatro horas. Se endurecen después con el alcohol, y así permanecen con los brazos perfectamente extendidos. Las larvas ya muy avanzadas se pueden matar muy bien con el sublimado concentrado, en el cual solo se dejarán algunos momentos para evitar que se disuelvan sus piezas calizas.

Asteroidéos.—Para preparar los Esteléridos con los pies ambulacrales bien extendidos, se hacen morir en alcohol de 20° á 30°, disponiendo el animal en el recipiente con los pies ambulacrales hacia arriba. La *Luidia*, provista de pies ambulacrales muy desarrollados, se pone vuelta hacia abajo en un cristalizador con un poco de agua de mar, y cuando sus pies están bien extendidos, se vierte encima de ella la mezcla cromo-acética, núm. 2; inmediatamente después el animal se pasa al alcohol débil.

En la *Brisinga* los brazos se desprenden con gran facilidad; para evitar esto se sumerge rápidamente en alcohol absoluto.

He obtenido preparaciones de *Bipinnaria* fijándolas con la mezcla cromo-acética, núm. 1, ó también con la cromo-ósmica, pero dejándola en esta pocos minutos. Las demás formas larvales se tratan por el sublimado concentrado.

Los Ofiuridos se hacen morir en agua dulce, y así quedarán extendidos y enteros. Algunas formas de poco tamaño *(Amphiura Ophiactis)* se pueden fijar directamente en alcohol débil.

La *Ophiomyxa pentagona*, que tiene el cuerpo blando, se endurece con ácido crómico al $^1/_2$ $^0/_0$. La *Ophiopsila annulosa*, que se rompe en pedazos en agua dulce, se matará directamente con el alcohol absoluto.

Equinoidéos.—Para preparar los erizos de mar con los pies ambulacrales bien extendidos, se ponen en un poco de agua de mar y se vierte encima la mezcla cromo-acética, núm. 2;

al momento deben pasarse al alcohol, para no dar tiempo á que el ácido ataque la cal del animal. Si se quieren conservar sólo por su forma ó para hacer su anatomía, se deben practicar en el dermato-esqueleto dos pequeños agujeros opuestos, para hacer salir todo el líquido que contienen dentro, y después pasarlos al alcohol y hacer que este rellene toda la cavidad interna. Al pasar el animal á alcohol más fuerte, se tendrá cuidado de cambiar también el de dentro. Las formas pequeñas se sumergen directamente en alcohol de 70° sin agujerearlas.

Si se quieren conservar en seco los erizos de mar, después de haber hecho salir el agua que contienen, se pondrán en alcohol de 70° por uno ó dos días, y después se dejarán secar al aire ó al sol.

Holoturioidéos.—Requieren más cuidado que los demás Equinodermos, porque además de tener el cuerpo blando y contráctil, todos están provistos de tentáculos que al contacto con los reactivos se contraen y esconden dentro del cuerpo. Además de esto muchas especies, apenas se sumergen en el líquido fijador, expelen fuera todos sus intestinos y se deforman por completo, lo cual hacen también en el agua de mar á poco que esta se altere.

Todos estos inconvenientes se remedian del modo siguiente: Antes que nada, como á todos los animales que hay que hacer distender, se los pone en agua de mar limpia. Se recomienda para aquellas especies que se han de hacer morir en los ácidos, no dejarlas estar en ellos sino el tiempo preciso para morir, pues sin esto se destruyen los cuerpos calizos de las epidermis.

Los grandes ejemplares de *Holothuria* y *Stichopus*, apenas tienen los tentáculos en plena distensión, se cogen apretándolos con los dedos ó con una pinza, un poco por debajo de los tentáculos, se sacan así del agua de mar y se sumerge toda su parte anterior en un recipiente algo profundo que contenga ácido acético concentrado. Al mismo tiempo otra persona debe inyectar alcohol á 90° con una jeringa cuya cánula se introduce por la abertura anal del animal; se echa el alcohol sin gran presión para evitar que se hinche demasiado todo el cuerpo del animal, y apenas muerta la *Holothuria*, se pone en alcohol de 70°, cerrando el orificio anal con un taponcito de corcho para evitar que, saliendo el líquido del interior, se des-

hinche el cuerpo. Las inyecciones se han de repetir cada vez que se mude el alcohol.

Para algunas especies, por ejemplo la *H. Poli*, la operación se debe hacer con gran cuidado, porque la piel se desprende con mucha facilidad.

La *H. impatiens*, que tiene el cuerpo delgado y alargado, se coge apretándola por el cuello para que no retire los tentáculos, y por el extremo posterior, para no dejar contraer el cuerpo, y en esta forma se sumerge todo el animal en ácido acético concentrado, y una vez muerto se pasa al momento al alcohol sin necesidad de hacer inyección.

Thyone, Thyonidium, Phyllophorus.—Se aprietan suavemente por el cuello y se sumerge todo el cuerpo en ácido acético, é inmediatamente después de fijados, se pasan al alcohol débil.

Si los individuos son muy pequeños, la presión por el cuello no se hace con los dedos sino con una pinza.

La *Cucumaria Plancii* se prepara como las grandes holoturias; sólo que la inyección del alcohol se ha de hacer por la boca, con el fin de hacer que los tentáculos queden distendidos, y no es necesario tapar luego la boca. Las demás especies se matan de la misma manera, y para las pequeñas no es precisa la inyección.

Las grandes *Synapta*, cuya preparación es muy difícil á causa de su tendencia á fraccionarse, se fijan sumergiéndolas en un tubo con agua de mar y éter en partes iguales; allí mueren completamente extendidas; se lavan poco después en agua dulce, pasándolas por los alcoholes muy graduadamente para evitar que se contraigan. Al éter se puede substituir el cloroformo.

El endurecimiento puede también hacerse mezclando al agua dulce en que se lavan, 2 ó 3 cc. de ácido crómico al 1 %, y pasándolas al alcohol débil pocos segundos después.

Por este procedimiento he fijado la rarísima *Molpadia musculus* y la pequeña *Chirodota venus*.

Las *auricularias* se matan bien con la mezcla de sulfato de cobre y sublimado ó bien con el sublimado solo.

MARINE BIOLOGICAL WOODS HOLL LIBRARY MASS

Enteropneustas.

El *Balanoglossus* se fija bien con el líquido de Kleinenberg ó en ácido crómico al $^1/_2$ $^0/_0$. Narcotizándolo en agua de mar alcoholizada, se obtienen ejemplares muy bien extendidos y rectos. La *tornaria* se mata con la mezcla de sulfato de cobre y sublimado, y también se puede lograr bien con el sublimado solo ó la mezcla cromo-ósmica.

Gusanos.

Los *Cestodes* se fijan con sublimado concentrado frío, y los *Trematodes* con el mismo, pero en caliente. Si se quieren tener preparaciones planas para poderlas montar al microscopio, se deben poner entre dos láminas de vidrio que se comprimen atándolas ó bien poniéndolas en un cristalizador con un ligero peso encima. Cuando los animales estén bastante aplanados entre los vidrios puestos en el fondo del cristalizador con un poco de agua de mar, se matan vertiéndolos encima sublimado concentrado hirviendo, y dejándolos dentro hasta que no den señal alguna de contracción; después, quitando los vidrios, se dejan fijar bien los animales en el sublimado concentrado ya frío, porque el sublimado hirviente, no penetrando bien entre los dos cristales, no fija sino las partes periféricas del animal.

De este modo he obtenido preparaciones bien extendidas y planas de *Tristomum*, *Acanthocotyle*, *Distomum*, *Calycotyle* y otros diversos Distomos y Polistomos.

Rabdocelos y Dendrocelos.—Apenas bien extendidos en un poco de agua, se matan con el sublimado concentrado hirviendo, é inmediatamente se vierte todo en un recipiente mayor que contenga agua dulce, para enfriar el líquido y los animales; de esta mezcla se pasan á agua dulce, y después de algunos minutos al alcohol. Para algunos Policicládidos *(Eurylepta, Pseudoceros)* es preciso que el sublimado esté poco caliente; de lo contrario, su cuerpo se disocia.

Las larvas de Müller se matan bien con el sublimado concentrado, frío ó caliente.

Nemertinos.—Mucha dificultad he encontrado para la preparación de estos gusanos, que apenas se encuentran en mal medio ambiente, se contraen fuertemente, expeliendo con fuerza su trompa, y fragmentándose á menudo. Durante algún tiempo obtuve buen éxito para narcotizar diversas especies, añadiendo poco á poco al agua de mar en que estaban, alcohol, el cual, mezclándose, obraba lentamente y mataba los animales; esta operación exigía gran atención, y frecuentemente también, cuando ya el gusano no daba ninguna señal de vida, transportado al líquido fijador, se contraía y deformaba. Para los grandes ejemplares de *Cerebratulus marginatus*, que no lograba hacer morir enteros por el método citado, solía sumergirlos rápidamente en una mezcla hecha con el líquido de Müller (7 partes) y ácido clorhídrico concentrado (1 parte), dejándolos en este líquido algunos minutos; y en él, si bien es cierto que al momento sacaban la trompa, no se fraccionaban.

Finalmente, después de reiterados experimentos logré (Junio de 1884) narcotizar los Nemertinos con una disolución de hidrato de cloral en agua de mar (1) al 1 $^{00}/_{00}$, en la cual deben permanecer de seis á doce horas, y se endurecen después en el alcohol en cajas de zinc alargadas con fondo de cera. Los animales narcotizados durante un tiempo breve, puestos otra vez en agua de mar, recobran sus movimientos y completa vitalidad.

Por este método he podido obtener buenas preparaciones de los géneros *Carinella*, *Cerebratulus*, *Drepanophorus*, *Nemertes*, *Polia*, etc., perfectamente extendidos y con la trompa en su estado natural; para los géneros más resistentes (*Langia Amphiporus* y también *Drepanophorus*), después de narcotizarlos en disolución al 1 $^{00}/_{00}$ de hidrato de cloral, será bueno dejarlos algunas horas en otra á 2 $^{00}/_{00}$ antes de matarlos.

Las formas larvales *pilidium* se matan, ó con la mezcla de

---

(1) Algún tiempo después el Dr. A. Foettinger, en una nota (*Renseignements téchniques*, en los *Archiv. Biol.*, tomo VI, pág. 115, 1885), donde habla del uso del hidrato de cloral para narcotizar algunos animales marinos, aconsejó hacer caer en el fondo del cristalizador en que están contenidos, algunos cristales de hidrato de cloral. Pero como justamente se hace observar en la pág. 425 del *Traité des méthodes téchniques de l'Anatomie microscopique* por Bolles Lée y Henneguy, este método, aplicado á los Nemertinos, no da buenos resultados, puesto que los animales sacan fuera la trompa.

sulfato de cobre y sublimado, ó con el sublimado concentrado.

Los *Nematodes* libres y parásitos los he matado siempre con el sublimado concentrado ó el líquido de Kleinenberg.

Quetognatos.—Se fijan muy bien con la mezcla de sulfato de cobre y sublimado ó con la cromo-ósmica.

Gefiréos.—Los *Sipunculus* se matan con el ácido crómico al $^1/_2$ $^0/_0$ ó aún más débil; la mayor parte morirán con la trompa extendida; narcotizados con hidrato de cloral al 1 $^{00}/_{00}$, en agua de mar, á veces mueren bien extendidos; pero sucede siempre con ambos métodos que una porción de estos animales queda contraída, ó que en algunos, durante la agonía, se rompe la piel por la parte anterior, sale todo el líquido perivisceral y el cuerpo se deforma en gran parte.

Los *Phascolosoma* se preparan bien en agua de mar alcoholizada, dejándolos en ella hasta que mueren (tres á seis horas).

El *Phoronis* se deja un par de horas en agua de mar alcoholizada, y después se mata con sublimado concentrado hirviente.

Para matar los grandes ejemplares de *Bonellia*, se espera á que hayan extendido bien su trompa, y entonces se agarra el cuerpo con una mano y la extremidad de la trompa con una pinza para tenerla extendida, y rápidamente se sumerge todo el animal en una cubeta alargada con fondo de cera que contenga líquido de Kleinenberg, y teniendo el animal siempre extendido, para impedir la contracción, se espera á que muera; entonces se deja todavía una hora en el líquido antes de pasarla al alcohol. Las *Bonellia* de poco tamaño se narcotizan con agua de mar alcoholizada, y se fijan con alcohol débil. Los machos pigméos de estos animales se fijan muy bien con el sublimado concentrado caliente.

Hirudinéos.—La *Pontobdella* y el *Branchellion* se matan con ácido crómico al $^1/_2$ $^0/_0$. El sublimado concentrado en caliente me ha dado buenos resultados en la preparación de un nuevo género, que en breve describirá S. Apathy bajo el nombre de *Pseudo branchellion*, y que fué encontrado sobre la *Thalassochelys corticata*. El método usado por Apathy para fijar los hirudinéos consiste en distenderlos en un recipiente con fondo de cera por medio de dos alfileres que se clavan en los extremos del cuerpo del gusano.

Quetópodos.—Muchos de ellos, cuando se ponen en un

líquido fijador demasiado enérgico, se contraen violentamente, se retuercen, y muchos se fragmentan, dando luego una mala idea de su forma natural. He remediado primeramente este inconveniente vertiendo poco á poco sobre la superficie del agua de mar, contenida en un cristalizador, una capa de una mezcla de glicerina (1 parte), alcohol á 70° (2 partes) y agua de mar (2 partes). Gradualmente, por difusión, esta capa se mezcla al agua de mar, y los animales, después de algunas horas, quedaban narcotizados hasta el punto de dejarse extender en alcohol más fuerte, en el que quedan bien extendidos y aun muchas veces con su trompa fuera.

La experiencia luego me ha demostrado que el alcohol por sí solo da este mismo resultado, y por esto, en vez de la mezcla dicha, mezclo al agua de mar un 5 % de alcohol absoluto y allí sumerjo los ejemplares que he de matar dejándolos hasta que pierden el movimiento, lo cual sucede en un tiempo que varía según las diversas especies (dos á doce horas). Debe procurarse que los animales no mueran por completo en el agua de mar. El endurecimiento se hace en alcohol de 70°, en las cajitas alargadas con fondo de cera de que hablamos, manteniendo recto el animal, cuando es necesario, por medio de alfileres; se deja así un par de horas y después se meten en un tubo en el que se deja permanecer horizontalmente por uno ó dos días: como el alcohol de 70° no penetra del todo en el interior de estos animales, para impedir la maceración es preciso conservarlos definitivamente en alcohol de 90°. Las especies de gran tamaño es conveniente dejarlas suspendidas en el tubo por medio de un hilo á un pequeño flotador.

Por el método ya dicho se preparan bien los anélidos pertenecientes á las siguientes familias: Poligórdidos, Ofélidos, Capitélidos, Teletúsidos, Maldánidos, Arícidos, Cirratúlidos, Espiónidos, Terebélidos, á excepción de los géneros *Polymnia* y *Lanice*, que se matan con la mezcla de sublimado y ácido crómico; de los Afrodítidos, algunos Polinoinos y todos los Sigalioninos; los Anfinómidos, que se pueden también fijar muy bien con el sublimado concentrado; de los Eunícidos, los Estaurocefalinos, los Lisaretinos y Lumbriconereinos. De la misma manera se fijan todos los Neréidos, Glicéridos, Silidos, Hesiónidos y Filodócidos.

También de la familia de los Clorémidos, los géneros *Styla-*

rioides y *Trophonia* se narcotizan con agua de mar alcoholizada; el *Siphonostomum diplochaitos,* de la misma familia, se mata con una solución de hidrato de cloral, al 5 %, endureciéndolo después con ácido crómico al 1 %. Este animal, tratado por los líquidos ordinarios, se rompe con la mayor facilidad.

Los Hermioninos se sumergen directamente en alcohol de 70° teniendo cuidado de no dejarlos morir encorvados.

Los Quetoptéridos, Esternáspidos, los grandes *Spirographis* y los grandes Serpulinos del género *Protula* (estos dos últimos se hacen antes salir de su tubo, con mucho cuidado), se matan en ácido crómico al 1 por 100, dejándolos al menos una media hora; después se lavan bien y se pasan al alcohol de 70° y luego al de 90°.

Con el sublimado concentrado frío, dejándolos permanecer en él solamente quince minutos, se matan los siguientes anélidos: todos los Amficténidos, los Hermélidos, los Serpúlidos, algunos de los cuales se dejan primero algunas horas en una solución de hidrato de cloral al 1 ‰, para hacer que salgan en todo ó en parte de su tubo; de los Afrodítidos, algunos Polynoinos, el *Polyodontes maxillosus;* de los Eunícidos, todo el grupo de los Eunicinos: algunos de estos, como la *Diopatra,* se fijan bien narcotizándolos en agua de mar alcoholizada.

Los Alciópidos se preparan muy bien haciéndolos morir con la mezcla de sulfato de cobre y sublimado, dejándolos en ella cuando más cinco minutos; se debe tener cuidado de lavarlos bien en agua dulce antes de pasarlos al alcohol.

Los Tomoptéridos se conservan por el método precedente ó con el sublimado concentrado frío.

Crustáceos.

Los *Cladóceros* marinos *(Podon, Evadne)* se matan con sublimado concentrado ó con algunas gotas de ácido ósmico al 1 por 100 en el agua de mar en que estén, hasta que comienzan á tomar un color pardo.

Los *Ostrácodos* directamente en alcohol á 70°.

Copépodos.—Los Copépodos libres se matan con una solución de sublimado concentrado en agua de mar, en la que se

dejan de cinco á diez minutos; los parásitos ó en el sublimado concentrado, como los libres, ó directamente en el alcohol débil.

Cirrípedos.—Para preparar los *Lepas*, *Conchoderma*, etc., con sus cirros bien extendidos, se matan con alcohol de 35°, y si en algunas especies se contraen, es fácil sacarlos al exterior con una pinza.

Los *Balanus*, etc., se ponen directamente en alcohol á 70° teniendo cuidado de cambiar bien el líquido.

Los Rizocéfalos *(Sacculina*, *Peltogaster*, etc.) se dejan durante quince minutos en una mezcla de alcohol á 90° y sublimado concentrado, en partes iguales, y luego se pasan al alcohol de 70°.

Anfípodos.—Todos los Lemodípodos, Gammarinos é Hiperinos, se preparan directamente con alcohol de 70°. Las formas transparentes del último grupo *(Phronima*, etc.) con el sublimado concentrado.

Isópodos.—En alcohol de 70° directamente, á excepción de los Bopíridos y Entoniscidos, los cuales se ponen en la mezcla de alcohol de 90° y sublimado concentrado, en partes iguales (como los Rizocéfalos), ó también con el sublimado concentrado.

Cumáceos.—Estomápodos.—En alcohol directamente. Las larvas transparentes de los Estomápodos en sublimado concentrado durante pocos minutos.

Esquizópodos.—En alcohol directamente ó en sublimado concentrado durante pocos minutos.

Para evitar que se desprendan los apéndices en los Decápodos, se hacen morir en agua dulce antes de ponerlos en alcohol, dejándoles solamente el tiempo necesario; de lo contrario se inflarían los apéndices membraniformes.

Para los Pagúridos es preciso tener cuidado de cambiar mucho el alcohol y conservarlos definitivamente en alcohol de 90°, porque la piel de su abdomen es muy poco permeable.

Las larvas de los Decápodos *(zoea, filosoma*, etc.), se fijan, ó en el sublimado concentrado ó con algunas gotas de ácido ósmico al 1 % en el agua de mar en que se encuentren.

Pantópodos.

Se matan con el ácido crómico al $^1/_2$ $^0/_0$ para hacerlos permanecer con las patas extendidas. Como por lo general suelen estar cubiertos de cuerpos extraños, es preciso dejarlos vivir por algunos días en un vaso de agua de mar fresca, para que allí se despojen de ellos.

Moluscos.

Para preparar los Lamelibranquios con las valvas abiertas, se narcotizan con agua de mar alcoholizada, en la que han de permanecer de seis á doce horas ó aún más, según las diversas especies.

Los Sifoniados no deben transportarse al alcohol sino cuando estén ya bien narcotizados; de otro modo se contraen los sifones. Para mayor precaución será bueno meter entre las dos valvas trocitos de madera para impedir que se cierren.

La *Lima*, que tiene una porción de tentáculos en el margen del manto, los cuales se desprenden con el procedimiento del agua alcoholizada, se matará con ácido crómico al $^1/_4$ $^0/_0$.

Escafópodos.—Los *Dentalium* se narcotizan con hidrato de cloral al 2 $^{00}/_{00}$, dejándolos dentro doce á catorce horas ó más, y pasándolos luego al alcohol de 70°.

Gastrópodos.—Prosobranquios.—Los Placóforos y las familias Patélidos, Fisurélidos y Haliótidos se preparan bien extendidos con el agua de mar alcoholizada.

Para evitar que los Prosobranquios de concha arrollada en espiral, los cuales se han de extender en agua de mar alcoholizada, al pasar al alcohol de 70° se retiren de nuevo por completo en su concha, es menester cuando están ya medio narcotizados en el agua de mar alcoholizada, mantenerlos en la máxima distensión posible, atando el limbo interno del opérculo á la concha.

La *Natica Josephinia* se puede fijar en completa distensión, añadiendo poco á poco al agua de mar alcohol de 70° hasta que el animal pierda la sensibilidad, lo cual, por lo general,

sucede á los dos ó tres días; después se mata vertiendo rápidamente encima de ella ácido acético concentrado, y al momento se pasa al alcohol débil. Si se quiere tener la seguridad de obtener al menos algunos individuos bien preparados, es preciso probar con muchos, pues si no siempre algunos de ellos quedan más ó menos contraídos.

Las *Natica mille-punctata* y *hebrea*, preparadas por el método anterior, quedan totalmente contraídas; al contrario, he obtenido buen resultado dejándolas por algunos días en la mezcla de agua de mar y agua dulce en partes iguales, y fijándolas después con el ácido acético.

Con la misma mezcla he preparado diversas especies de *Nassa, Columbella, Conus* y *Trochus*, con los animales bien extendidos.

Heterópodos.—Los Atlántidos se narcotizan con agua de mar alcoholizada, dejándolos en ella de seis á doce horas; después se matan directamente con alcohol.

Los Pterotraquèidos se matan, metiéndolos en la mezcla cromo-acética, núm. 1, durante diez á treinta minutos, según su magnitud, lavándolos después en agua dulce y pasándolos luego gradualmente por los diversos alcoholes. También se preparan bien estos animales con la mezcla cromo-ósmica, y los ejemplares pequeños de *Carinaria* muy bien con la mezcla de sulfato de cobre y sublimado; las grandes especies se suspenden en el recipiente definitivo, atándoles un hilo al extremo de la trompa.

Opistobranquios.—Los Búlidos se narcotizan lentamente en la mezcla de agua de mar y agua dulce en partes iguales, donde permanecen hasta que pierden la sensibilidad; se matan finalmente con ácido acético concentrado é inmediatamente se pasan al alcohol.

El *Gastropteron Meckelii* se fija muy bien con el líquido de Kleinenberg, conservándose un tanto su color rojo, que si no desaparece con los líquidos ordinarios.

El *Doridium* y el *Scaphander* se narcotizan en agua de mar alcoholizada, y se matan con el ácido acético concentrado, pasándolos al momento al alcohol.

La *Philine* se deja un poco en agua de mar, y cuando está bien extendida, se mata vertiendo bruscamente encima de ella ácido acético concentrado ó ácido piroleñoso concentrado.

La *Pleurophyllidia* se narcotiza con agua de mar alcoholizada y después se mata con ácido acético concentrado.

Las *Aplysia limacina* y *punctata* se fijan con ácido crómico al 1 % en el que permanecen de quince á sesenta minutos según su magnitud. La *A. depilans* se deja por doce horas en hidrato de cloral al 1 ‰ y después se fija como las especies precedentes.

La *Pleurobranchea Meckelii* se prepara con ácido acético al 1 % en el que se deja una hora.

Los *Pleurobranchus Meckelii* y *testudinarius* se matan con ácido crómico al 5 % y apenas muertos se pasan al de 1 % en el que permanecen de quince á sesenta minutos según su tamaño. Los ejemplares pequeños se pueden preparar bien con el hidrato de cloral al 1 ‰, fijándolos después en ácido crómico al 1 %.

La *Umbrella* se mata lentamente con agua de mar alcoholizada, pasándola después al alcohol débil.

Los Elisíidos y Eolidíidos se deja que se extiendan bien en un poco de agua, y después se matan, vertiendo encima rápidamente ácido acético concentrado en un volumen igual ó doble del agua que los contenía, y luego, apenas muertos, se pasan al alcohol débil.

El *Phillirrhoe bucephalum* se fija durante pocos minutos en la mezcla cromo-ósmica ó en la cromo-acética, núm. 1.

Doris, *Chromodoris*, etc.—Las formas más grandes de estos animales se narcotizan añadiendo poco á poco al agua en que se encuentran, alcohol de 70°, y cuando tocando los apéndices branquiales del dorso, no se contraen, se matan con ácido acético concentrado ó con sublimado concentrado hirviendo. Para las formas pequeñas no es menester narcotizarlas.

La *Triopa*, *Idalia* y *Polycera* se fijan bien con el ácido acético concentrado como los Elisíidos.

Los grandes ejemplares de *Tritonia* se sumergen en agua dulce, añadiéndoles algunas gotas de ácido acético hasta que mueren y después se endurecen con el ácido crómico al ½ %. Con este método quedan bien extendidos y no sufren ninguna alteración. La *Marionia* se narcotiza en agua de mar alcoholizada y se mata con el ácido acético.

Para preparar la *Tethys* con los apéndices dorsales en su posición, se deja extender bien en un recipiente bajo y ancho,

en la menor cantidad posible de agua, pero suficiente para cubrir el animal y allí se mata vertiendo encima ácido acético concentrado en cantidad al menos igual á la del agua de mar, y poco después el animal muere en un estado de ligera contracción. Entonces con un sifón se quita el líquido y se sustituye con ácido crómico al 1 %, en el que con cuidado se trata de dar al animal su forma primitiva, estirando el pie, que se hace apoyar sobre el fondo liso del recipiente, y el lóbulo cefálico, que fácilmente queda contraído. De esta manera se endurece y á la media hora con un sifón se sustituye alcohol débil al ácido crómico. Es preciso que el animal quede suspendido en el recipiente definitivo.

Pterópodos.—Los Hialéidos se colocan en un poco de agua, y cuando el animal ha extendido bien las dos aletas, se vierte encima sublimado concentrado y después de un par de minutos se lava. La *Creseis acicula*, se prepara bien matándola con agua de mar alcoholizada.

Los Cimbúlidos se fijan muy bien con el líquido de Perenyi (1), dejándolos en él unos quince minutos, y pasándolos después al alcohol de 50°; si se preparan con la mezcla cromoósmica, su forma se conserva perfectamente, pero pierden en parte la transparencia.

Los Gimnosomas se dejan en hidrato de cloral al 1 ‰, de seis á doce horas y después se matan rápidamente con ácido acético ó con el sublimado. A menudo he obtenido buenas preparaciones de la *Cliopsis* haciéndola morir en ácido crómico al ¼ %.

Cefalópodos.—Las preparaciones resultan mucho mejores cuando los animales se sumergen aun vivos en los líquidos; los ya muertos desde algún tiempo y que se han tenido en seco, se dejan próximamente una hora en agua de mar, donde recobraran algún tanto sus formas, y después lo mejor es fijarlos con ácido crómico al 1 %, dejándolos en él quince á sesenta minutos según su tamaño.

Los Octópodos pequeños se narcotizan con el hidrato de cloral al 2 ‰ y luego se matan directamente con alcohol;

---

(1) 4 volúmenes de ácido nítrico al 10 %.
3 íd. de íd. crómico al ½ %.
3 íd. de alcohol de 90°.

á veces se contraen escondiendo el cuerpo entre los brazos, pero luego, después de muertos, es fácil restituirles su forma natural.

Los animales de mayor tamaño (de la longitud de más de 15 cm.), se fijan con ácido crómico al 1 $^0/_0$, en el que permanecerán media hora, ó dos, si son muy grandes; después se lavan con agua dulce y de alli se pasan al alcohol de 70° que se cuidará de renovar diversas veces.

El *Ocythoe catenulata (Philonexis)* ♀, de cualquier tamaño que sea, se puede poner directamente en alcohol de 70°, distendiéndole los brazos. El *Scaeurgus tetracirrhus (Octopus)* se mata con la mezcla de alcohol y ácido crómico, y á los veinte minutos se pasa al alcohol.

Los Decápodos se pueden fijar directamente con alcohol de 70°, teniendo cuidado, apenas muertos, de distenderles los dos brazos tentaculares que generalmente se contraen. Las especies pequeñas será bueno narcotizarlas primeramente, ó en hidrato de cloral al 2 $^{00}/_{00}$ ó bien en agua de mar alcoholizada, y después sumergirlos directamente en alcohol.

Para hacer que el alcohol penetre mejor en los intestinos de los grandes ejemplares se hace un corte delgado en la parte ventral del cuerpo.

Las formas pelágicas transparentes *(Loligopsis, Verania)* se sumergen en líquido de Kleinenberg y después de una hora se pasan al alcohol débil. Los huevos que forman racimos ó que están agrupados, provistos cada uno de una envoltura propia, se fijan con ácido crómico al $^1/_2$ $^0/_0$ y después de tenerlos una hora en alcohol débil, se pasan gradualmente al de 70°. Los que están contenidos en una sustancia gelatinosa, común á todos, después de fijarlos con ácido crómico al $^1/_2$ $^0/_0$, se pasan á alcohol de 50° en el que se conservan definitivamente.

Briozóos.

Los géneros *Pedicellina* y *Loxosoma* se dejan por una hora en hidrato de cloral al 1 $^{00}/_{00}$ y después se matan con sublimado concentrado frío ó caliente, lavándolos inmediatamente después.

Algunas especies de *Bugula (purpureotincta, turbinata)*,

después que están bien extendidas en un poco de agua de mar, se matan rápidamente con sublimado concentrado caliente.

Añadiendo lentamente alcohol de 70° á la superficie del agua en que están, he podido obtener en estado de completa distensión, *Flustra*, *Cellepora*, *Crisia*, *Bugula* y *Zoobotrium;* las otras especies se pueden matar, con los animales más ó menos fuera de sus celdillas, con soluciones débiles de hidrato de cloral ó con agua de mar alcoholizada, pero generalmente el buen éxito depende de la habilidad del preparador.

Braquiópodos.

Se narcotizan dejándolos en agua de mar alcoholizada algunas horas, y antes de pasarlos al alcohol, se mete entre las valvas un pedacito de madera, para evitar que se cierren. Los ejemplares pequeños se ponen directamente en alcohol de 70°.

Tunicados.

Las *Apendiculáridas* se fijan dejándolas cinco minutos en la mezcla cromo-ósmica.

Ascidias simples.—Para fijar la *Clavellina* y la *Perophora*, de modo que los orificios queden abiertos, se dejan primero extender bien en agua de mar corriente, y luego se sumergen en la disolución de hidrato de cloral al 1 $^{00}/_{00}$, en el que se dejan de seis á doce horas; después se las mata con la mezcla cromo-acética, núm. 2, é inmediatamente después se pasan al ácido crómico al 1 $^{0}/_{0}$, del cual también se hace una inyección por la boca de cada individuo. Media hora más tarde se pasan al alcohol de 35°, repitiendo la inyección con este líquido, y finalmente á alcohol de 70°.

La *Ascidia (Phallusia)* se deja de tres á seis horas en hidrato de cloral al 1 $^{00}/_{00}$ y después se endurece con ácido crómico al 1 $^{0}/_{0}$, dejándola en él media hora.

La *Ciona intestinalis*, se mata lentamente haciendo caer en el agua de mar, en que está extendida, pocas gotas de mezcla cromo-acética, núm. 2; cuando el animal está muerto, lo que

sucede próximamente (1) á la media hora, se coge por el orificio anterior para evitar que se vacíe el agua que contiene, y se pasa al ácido crómico al 1 %, inyectándolo también con una pipeta en el interior del animal; de la misma manera se pasa después al alcohol débil.

Algunas Ascidias *(Ascidia* y *Rhopalea)* se pueden matar con los orificios abiertos de la siguiente manera: se ponen en un vaso más bien alto, lleno de agua de mar de modo que la superficie de este quede 4 á 5 cm. al menos por encima del animal, y se vierten lentamente algunas gotas de ácido crómico al 1 %, de manera que formen un ligero estrato en la superficie del agua; poco á poco el ácido crómico se esparce por toda el agua, matando los animales al cabo de un tiempo que varía de doce á veinticuatro horas. Antes de endurecerla en ácido crómico al 1 %, es siempre bueno asegurarse de que la ascidia está muerta, y si no lo está, se añade de nuevo una pequeña cantidad de ácido crómico.

Para las *Molgula*, *Polycarpa*, *Rhopalea* y *Chevreulius (Rhodosoma)*, es necesario dejarlas doce horas en hidrato de cloral al 1 ‰, matarlas después con la mezcla cromo-acética, número 2, y endurecerlas después con el ácido crómico al 1 % por poco tiempo.

Cinthia y *Styela* se narcotizan con hidrato de cloral al 2 ‰ durante veinticuatro horas y después se tratan como las especies precedentes. A veces la *C. papillosa*, al ponerla en el hidrato de cloral al 2 ‰, contrae mucho el cuerpo; entonces se debe volver á colocar en el agua de mar corriente y repetir luego la prueba con el hidrato de cloral al 1 ‰.

Ascidias compuestas.—Las formas gelatinosas, por ejemplo, Botrilidos, *Polycyclus*, *Circinalium* y *Fragarium*, se dejan durante un par de horas en hidrato de cloral al 1 ‰ y se matan vertiendo sobre la colonia sublimado concentrado caliente; inmediatamente después se pasan al ácido crómico al ½ %, en el que permanecen una media hora.

La *Distaplia* después de narcotizada con el cloral se mata

---

(1) El Dr. Garbini en su *Manuale per il microscopista*, pág. 372, dice que para matar las ascidias por este método (visto por él en la Estación Zoológica), se requieren cuatro ó cinco días.

con la mezcla cromo-acética núm. 2 y después se pasa directamente al alcohol débil.

La *Diazona violacea* se debe tener doce horas en el hidrato de cloral al 2 $^{00}/_{00}$, y después de la muerte y el endurecimiento, se trata como los Botrilidos, con la diferencia que se debe inyectar el líquido con una pipeta en cada animal.

El *Leptoclinum* y otras formas de cierta consistencia se pasan directamente del cloral al alcohol.

El *Pyrosoma* se sumerge, suspendido de un hilo, en alcohol clorhídrico, contenido en un recipiente cilíndrico; después de un cuarto de hora se pasa al alcohol de 60°, y sucesivamente á los alcoholes más fuertes. Sucede á menudo que en la colonia se forman una porción de burbujas de aire, que acaban por desaparecer al cabo de algún tiempo, cuando el animal está definitivamente conservado.

Los Sálpidos comprenden animales de consistencia muy variada, desde la mucosa á la cartilagínea, y ciertas especies que cuando jóvenes son fuertes, cuando adultas son blandas y de difícil conservación.

Muchas veces las Salpas, cuando están sumergidas en el líquido fijador, se contraen muchísimo, cierran los orificios y en esta posición mueren. Esto se evita introduciendo una varilla de vidrio por uno de los orificios, y así, penetrando el líquido, el animal toma su forma natural.

a) Las especies de cuerpo consistente *(Salpa bicaudata;* solitaria joven, *S. Tillesi*, encadenada y solitaria, *S. Zonaria*, encadenada y solitaria) se ponen en una mezcla de agua dulce (100 c. c.) y ácido acético (10 c. c.), en la cual se dejan durante quince minutos. Después se lavan durante diez minutos en agua dulce y se pasan gradualmente al alcohol, en el que es necesario que las especies más gruesas se suspendan por medio de un alfiler encorvado, atado á un hilo, y que se eleve en la porción gelatinosa que rodea el núcleo intestinal. De esta manera los animales quedan bastante transparentes, formándose en los tejidos una cantidad de cristales de sales marinas mucho menor que en los demás líquidos.

b) Las formas semiduras (cadenas jóvenes y formas solitarias de *S. maxima* y *pinnata*, cadenas jóvenes de *S. bicaudata*, las dos formas adultas de *S. fusisformis* y *democrática-mucronata)* se fijan durante diez minutos con la mezcla cromo-acé-

tica, núm. 1, y después se pasan directamente al alcohol débil.

c) Las formas blandas (grandes ejemplares en cadena de *S. bicaudata* y *punctata*, las dos formas de *S. maxima pinnata* y *virgola)* se sumergen de quince á sesenta minutos en la mezcla cromo-ósmica, según su magnitud, después se lavan en agua dulce y se pasan al alcohol débil.

Los ejemplares muy grandes de la *S. maxima*, al ponerlos en alcohol débil, se deforman por el peso de su propio cuerpo; he podido evitar este inconveniente, bien inyectando en la cavidad del animal algunas burbujas de aire, ó bien haciendo entrar en esta cavidad un delgado tubo de vidrio cerrado en sus extremos y que contenga aire. Esto hasta que el animal esté perfectamente endurecido.

El profesor Todaro, al conservar las Salpas, para estudiarlas histológicamente, las sumerge directamente en el líquido de Kleinenberg durante dos horas, y después las pasa al alcohol. Pero de esta manera, salvo las especies duras, todas las demás pierden su forma.

Se puede fácilmente inyectar en las Salpas vivas el sistema circulatorio con azul de Prusia soluble, metiendo la extremidad de una jeringa de cánula delgada en el corazón y haciendo solo una ligerísima presión; después de esto los animales pueden ser tratados por los métodos ya dichos, y el color queda siempre bien conservado aun cuando se pasen al alcohol.

Los Doliólidos dan buenas preparaciones matándolos con la mezcla de sulfato de cobre y sublimado; después de un par de minutos se lavan bien con agua dulce y gradualmente se pasan al alcohol de 70°. Con sublimado concentrado y con la mezcla cromo-ósmica se fijan también satisfactoriamente.

Peces.

En general no presentan dificultad para su preparación. A ser posible se deben meter aún vivos en el líquido fijador, porque solamente así conservan bien las formas del cuerpo y las aletas bien distendidas, mientras que los ya muertos desde algún tiempo han perdido bastante agua, tienen las aletas contraídas y desecadas, y al ponerlos en el alcohol se contraen aún más.

Para preparar el *Amphioxus* con los cirros bucales bien extendidos, se mata con agua de mar alcoholizada al 10 %, y después de muerto, lo cual ordinariamente sucede á los pocos minutos, se pasa al alcohol de 50°, cuyo título gradualmente se eleva á 70°. También con el líquido de Müller (1) se consiguen buenas preparaciones, pero el animal queda siempre coloreado y muchas veces se deforman los costados del cuerpo.

Ciclóstomos, Selacios y Ganoideos.—Los ejemplares pequeños se sumergen directamente en alcohol de 70°; para las formas mayores, en las cuales el alcohol difícilmente puede penetrar en los intestinos, es preciso hacer una incisión en el vientre; también basta la inyección de alcohol de 90° por el ano, sucesivamente repetida á cada cambio de alcohol.

Algunas especies de consistencia blanda, como el *Torpedo*, se fijan mejor dejándolas media hora en el ácido crómico al 1 %.

Los embriones de selacios (de 1-10 cm. de longitud) se fijan con sublimado concentrado, en el que se dejan 5-15, teniendo luego cuidado de lavarlos bien con alcohol yodado. Así preparados pueden servir también para investigaciones histológicas. He conservado bastante bien embriones de *Torpedo* con toda la masa vitelina, poniéndolos en una mezcla de ácido crómico al 1 % y sublimado concentrado en partes iguales durante quince minutos, y pasándolos después al alcohol débil.

Los embriones más grandes (de más de 10 cm. de longitud), si se quieren conservar para estudios histológicos, se pueden preparar lo mismo que los pequeños; pero si solo se quiere conservar su forma, se dejan próximamente una hora en ácido crómico al 1 %, lavándolos en agua dulce antes de pasarlos al alcohol.

Los grandes selacios, si se quieren conservar por algunos meses, para luego preparar el esqueleto ó conservar la piel, se debe, extraídos los intestinos abriendo el vientre, sumergirlos en una solución de cloruro de sodio al 10 %.

---

(1) Bicromato potásico, 2 gramos; sulfato de sosa, 1 gramo; agua destilada, 100 gramos.

Los *Teléosteos* se tratan como los selacios; pero penetrando el alcohol más difícilmente en ellos, es necesario, sobre todo para las formas grandes, inyectarlo en el cuerpo y renovar muy á menudo el líquido.

Los teleósteos de piel plateada *(Trachypterus)* se fijan durante algunos minutos en sublimado concentrado; las formas larvales transparentes, en alcohol débil ó en sublimado concentrado.

Los huevos fecundados transparentes se pueden conservar para la enseñanza, dejándolos algunos minutos en alcohol clorhídrico y pasándolos después al alcohol puro.