

## MICROALGAS EN LA LAGUNA EL HATO, ESTADO NUEVA ESPARTA, VENEZUELA

### Microalgae taxonomy in The Hato lagoon, Nueva Esparta State, Venezuela

**José BERNAL**

*Universidad de Oriente, Escuela de Ciencias,*

*Departamento de Biología.*

*Apdo. Postal 6101, Cumaná, Venezuela*

*bjose@udo.edu.ve*

#### RESUMEN

En la laguna El Hato se muestreó durante un año en tres estaciones con el fin de determinar la diversidad de microalgas pertenecientes a las divisiones Chlorophyta, Cyanobacteria y Euglenophyta, que contribuya con los estudios científicos que se vienen realizando para la conservación de este importante ecosistema acuático. Como resultado se identificaron 28 especies. La división Chlorophyta está representada por 19 especies, Euglenophyta por seis y Cyanobacteria por tres especies. Se citan por primera vez 17 especies para el estado Nueva Esparta, 11 pertenecientes a la división Chlorophyta, cinco a la Euglenophyta y una Cyanobacteria. El género *Cosmarium* fue el mejor representado en las muestras estudiadas.

**Palabras clave:** Chlorophyta, cianobacteria, Euglenophyta, laguna, microalga

#### ABSTRACT

The Hato lagoon was sampled in three stations during a year, in order to determine the diversity of micro algae belonging to Chlorophyta, Cyanobacteria and Euglenophyta divisions, that contribute with scientific studies have been conducted to conserve this important aquatic ecosystem. Twenty eight species were identified. Chlorophyta was represented by 19 species, Euglenophyta by six and Cyanobacteria by three species. Seventeen new records to Nueva Esparta State were found, 11 species belong to Chlorophyta, five to Euglenophyta and only one species to Cyanobacteria. *Cosmarium* genus was the most representative micro algae.

**Key words:** Chlorophyta, Cyanobacteria, Euglenophyta, lagoon, microalgae

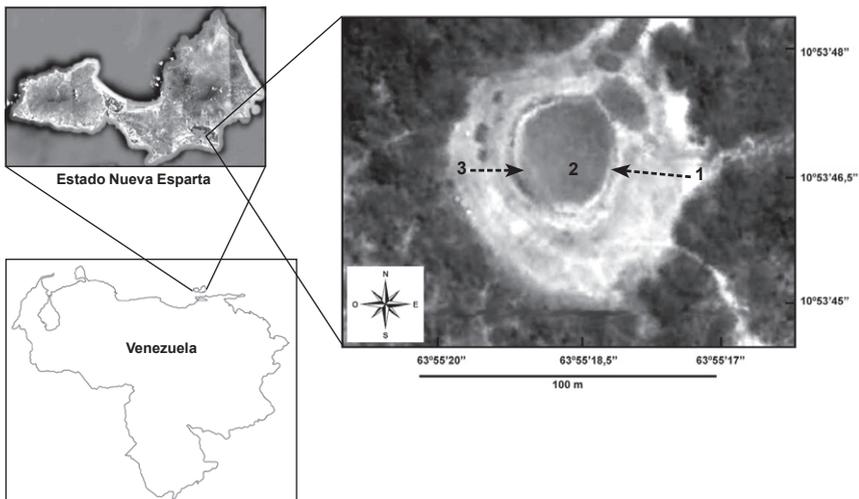
#### INTRODUCCIÓN

El término alga, desde el punto de vista taxonómico, fue usado para denominar a una enorme variedad de organismos con diferencias en cuanto a su morfología, reproducción, fisiología y ecología (Bicudo & Menezes 2005). Entre los numerosos estudios taxonómicos de algas dulceacuícolas realizados en Venezuela, se pueden citar: Yacubson (1969), Vegas & Riehl (2001), Salazar & Guarrera (2000), Delgado *et al.* (2003), Bernal *et al.* (2005); para el estado Nueva Esparta sólo se conoce el trabajo de Margalef (1961), quien indica la escasez de ecosiste-

mas dulceacuícolas en dicho estado debido a sus condiciones climáticas; la laguna El Hato es uno de los pocos ecosistemas dulceacuícolas. Esta laguna se ubica en el Monumento Natural Laguna de Las Marites (estado Nueva Esparta). El objetivo de esta investigación fue determinar la composición de microalgas pertenecientes a las divisiones Chlorophyta, Cyanobacteria y Euglenophyta, que contribuya con los estudios científicos que se vienen realizando para la conservación de este importante ecosistema acuático.

## MATERIALES Y MÉTODOS

La laguna El Hato se encuentra en el Monumento Natural Laguna de Las Marites, municipio García, Isla de Margarita, estado Nueva Esparta, Venezuela, ubicada entre los  $10^{\circ}53'48''$ - $10^{\circ}53'45''$  N,  $63^{\circ}55'20''$ - $63^{\circ}55'17''$  O (Fig. 1). Es un cuerpo de agua continental con paisaje kárstico que, durante el período de intensa sequía (septiembre-octubre), presenta una profundidad promedio de 1,80 m, mientras que en los meses de máximas precipitaciones (noviembre-enero) alcanza una profundidad de hasta 4 m (Fig. 2, 3) (Rodríguez *et al.* 2008).



**Fig. 1.** Mapa del área de estudio y ubicación de las estaciones. Las líneas punteadas muestran el desplazamiento de las estaciones 1 y 3 durante la sequía.

Los muestreos se realizaron mensualmente durante un año en tres estaciones con una red de fitoplancton, filtrando 30 l de agua superficiales (0 a 20 cm) y el perifiton se tomó de muestras de plantas acuáticas (hojas, raíces y tallos); durante la sequía, las estaciones 1 y 3 debieron reubicarse (Fig. 1) por la considerable disminución en el nivel de agua de la laguna. Para los análisis de laboratorio se usó un microscopio de luz triocular, con micrómetro ocular, cámara clara y cámara fotográfica. Las muestras fijadas en formalina al 4% se almacenaron en el Laboratorio



**Fig. 2.** Panorámica de Laguna El Hato (época de intensa sequía)



**Fig. 3.** Panorámica de Laguna El Hato (época de lluvia)

rio de Botánica Criptogámica del Departamento de Biología de la Universidad de Oriente (Cumaná) para su posterior análisis. Para la identificación taxonómica se emplearon claves, dibujos, fotografías y descripciones, aportados por los trabajos disponibles de diversos autores. Se incluyen descripciones morfológicas y microfotografías de cada especie. La escala en todas las figuras vale 10  $\mu\text{m}$ .

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se identificó un total de 28 especímenes, correspondientes a tres divisiones: Chlorophyta con 19 especies pertenecientes a seis órdenes, seguida de Euglenophyta con seis especies, todas ubicadas en un mismo orden, y Cyanobacteria con tres especies distribuidas en dos órdenes. De éstas se citan por primera vez 17 especies para el estado Nueva Esparta. El género *Cosmarium* (Chlorophyta) fue el mejor representado. Cabe señalar que durante los muestreos, en el lapso entre agosto y diciembre, se observaron afloramientos de *Microcystis aeruginosa*, *Botryococcus braunii* y *Chlorella vulgaris*. Este fenómeno coincidió con el período de lluvia y finalización de éste; según Sant'Anna *et al.* (2004), *M. aeruginosa* presenta este comportamiento en aguas eutróficas. Es probable que el agua de esorrentía, producto de las lluvias, aumente los niveles de nutrientes, y la desecación del agua durante la sequía los mantenga elevados ya que se concentran, favoreciendo así las condiciones para las floraciones de estas microalgas. En la Tabla 1 se muestra la lista de especies registradas durante el período de estudio en las tres estaciones de muestreo.

**Tabla 1.** Especies registradas en la laguna El Hato.

División Orden Familia Especie	Estaciones		
	1	2	3
Cyanobacteria			
Chroococcales			
Chroococcaceae			
* <i>Microcystis aeruginosa</i> Kützing	X		X
Oscillatoriales			
Nostocaceae			
<i>Anabaena</i> sp.	X	X	X
Scytonemataceae			
<i>Spirulina</i> sp. West & West	X	X	
Chlorophyta			
Zygnematales			
Desmidiaceae			
* <i>Closterium moniliferum</i> (Bory) Ehrenberg	X		X

Tabla 1. Continuación.

División Orden Familia Especie	Estaciones		
	1	2	3
* <i>C. peracerosum</i> Gay	X	X	
* <i>C. venus</i> Croasdale	X		
<i>Cosmarium fontigenum</i> Nordst	X	X	X
<i>C. formolusum</i> Hoffman	X	X	X
* <i>C. portianum</i> Archer	X	X	X
<i>C. regnellii</i> Willey	X	X	
<i>C. subcrenatum</i> Hantzsch	X	X	X
<i>Cosmarium</i> sp. 1	X		
* <i>Euastrum bidentatum</i> Nägeli	X		X
<i>E. hypochondrum</i> Nordst	X		
<i>Staurastrum</i> sp.	X	X	
* <i>Stauroidesmus dickiei</i> Ralfs	X	X	X
Zygnemataceae			
<i>Mougeotia</i> sp.	X		
Chlorococcales			
Botryococcaceae			
* <i>Botryococcus braunii</i>	X		X
Hydrodictyceae			
* <i>Pediastrum tetras</i> var. <i>tetraodon</i> (Ehrb.) Ralfs			
Chlorellales			
Chlorellaceae			
* <i>Chlorella vulgaris</i> Beijerinck	X		X
Scenedesmaceae			
* <i>Scenedesmus ecornis</i> (Ralf) Chodat	X	X	
Volvocales			
Volvocaceae			
* <i>Pandorina morum</i> (Muell) Bory	X	X	X
Euglenophyta			
Euglenales			
Euglenaceae			
* <i>Euglena spirogyra</i> Ehrenberg	X	X	X
* <i>Lepocinclis salina</i> Conrad	X	X	X
* <i>Phacus pleuronectes</i> Müller	X	X	X
* <i>P. tortus</i> Lemm.	X	X	X
* <i>Trachelomonas volvocina</i> Ehrenberg	X	X	X
<i>Trachelomonas</i> sp. 1	X	X	X

\* = nuevas citas para el estado Nueva Esparta

De la presente investigación se puede deducir que en la Laguna El Hato se producen cambios en los niveles de nutrientes durante la temporada de lluvia y en el inicio de la sequía, que podrán estar favoreciendo los afloramientos de las especies *Microcystis aeruginosa*, *Chlorella vulgaris* y *Botryococcus braunii*.

Debido al alto porcentaje de especies nuevas identificadas en este trabajo (60,71%), considerando la estructura insular y la escasez de ambientes dulceacuícolas en el estado Nueva Esparta, es recomendable seguir con los estudios taxonómicos en la laguna El Hato y cuerpos de agua temporales para contribuir a incrementar el conocimiento de la diversidad microalgal, siendo necesario complementar el estudio taxonómico con el análisis de los procesos de sucesión espacio-temporal de las microalgas, que se producirían con los cambios en los niveles de nutrientes. Esto contribuiría con los estudios científicos que se vienen realizando para la conservación de este importante ecosistema acuático continental en el Monumento Natural Laguna de las Marites.

### **Descripción de las especies de microalgas que son nuevos registros para el estado Nueva Esparta**

#### **CYANOBACTERIA**

##### ***Microcystis aeruginosa* (Fig. 4a)**

Colonias planctónicas con formas irregulares alargadas lobuladas, cuando son adultas. Cuando son colonias jóvenes son redondas (Sant'Anna *et al.* 2004), encerradas en mucílago transparente, células esféricas de 3-6  $\mu\text{m}$  de diámetro, el contenido de éstas es de color gris pálido.

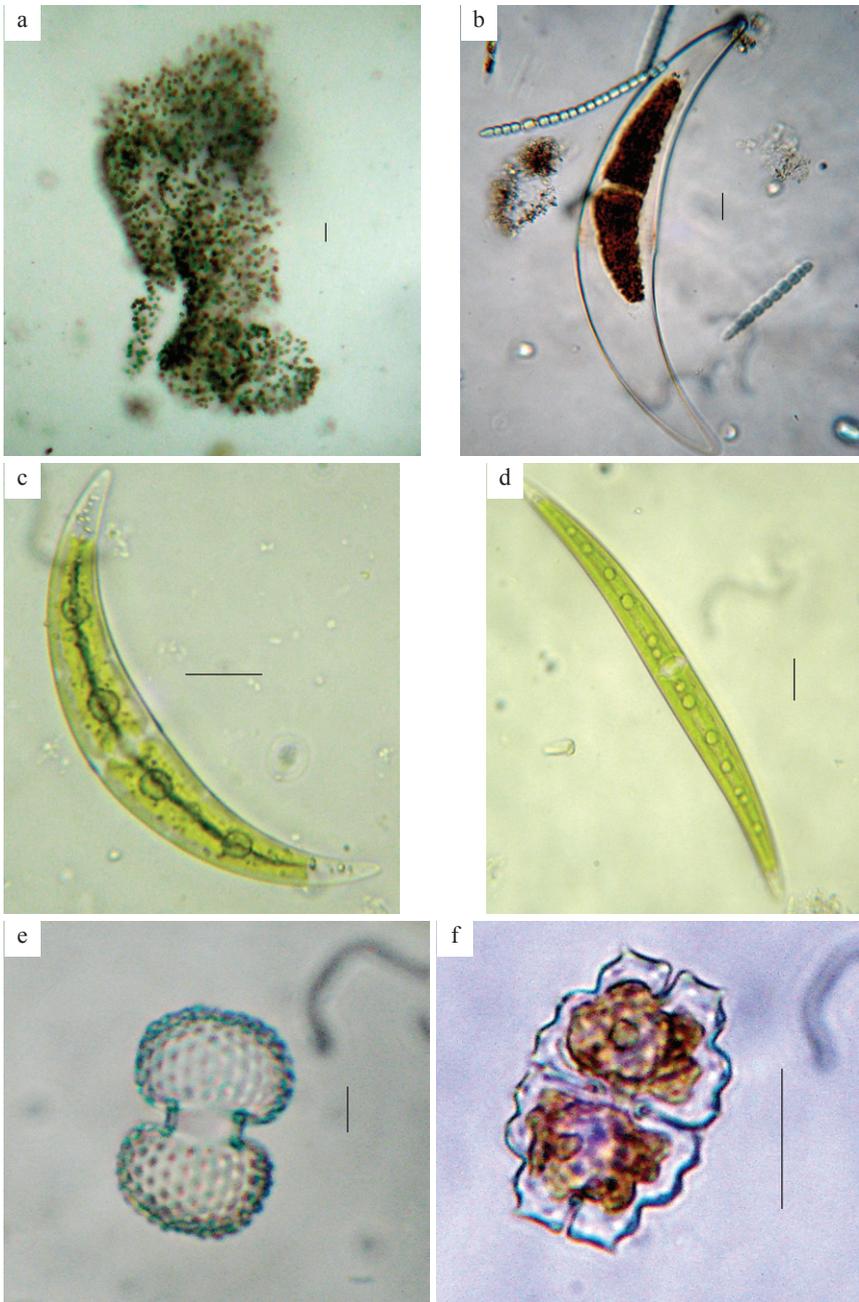
**Referencias:** Taft & Taft (1971), González & Riehl (1992), Bicudo & Menezes (2005), Sant'Anna *et al.* (2004)

#### **CHLOROPHYTA**

##### ***Closterium moniliferum* (Fig. 4b)**

Célula curvada con pared celular lisa, de 210-250  $\mu\text{m}$  de largo, 39-45  $\mu\text{m}$  de ancho; extremos redondeados, la célula en su parte media presenta una leve dilatación. Cloroplasto con 5 a 6 pirenoides por hemisoma. Se colectó en el perifiton.

**Referencias:** Delgado (1967), Yacubson (1980), Bicudo *et al.* (1992), Mirande & Tracanna (2004).



**Fig. 4.** a. *Microcystis aeruginosa*. b. *Closterium moniliferum*. c. *C. venus*. d. *C. peracerosum*. e. *Cosmarium portianum*. f. *Euastrum bidentatum*.

***Closterium venus*** (Fig. 4c)

Célula curvada con pared celular lisa atenuándose hacia los extremos redondeados, de 70-80  $\mu\text{m}$  de largo, 14-18  $\mu\text{m}$  de ancho. Cloroplasto con 2 pirenoides. Se colectó en el perifiton.

**Referencias:** Yacubson (1980), Riehl & Infante (1987).

***Closterium peracerosum*** (Fig. 4d)

Célula ligeramente curvada, de 158-170  $\mu\text{m}$  de largo, 12,5-16  $\mu\text{m}$  de ancho con la pared celular lisa. Zona media ligeramente recta, atenuándose a los extremos, ápices ligeramente truncados. Cloroplasto con 4 a 7 pirenoides por hemicélula, distribuidos en una línea central. Se colectó en el perifiton.

**Referencias:** Yacubson (1980).

***Cosmarium portianum*** (Fig. 4e)

Alga de 37-44  $\mu\text{m}$  de largo, 31-33  $\mu\text{m}$  de ancho, istmo de 11-13  $\mu\text{m}$  de ancho. Pared celular con gránulos, hemisomas reniformes, istmo ligeramente alargado, con los senos abiertos. En vista apical los hemisomas son elípticos. Un cloroplasto por hemisoma con dos pirenoides. Se colectó en el plancton y perifiton.

**Referencias:** Taft & Taft (1971), Lind & Brook (1980), Rodríguez & Felisberto (2004), Bicudo & Menezes (2005).

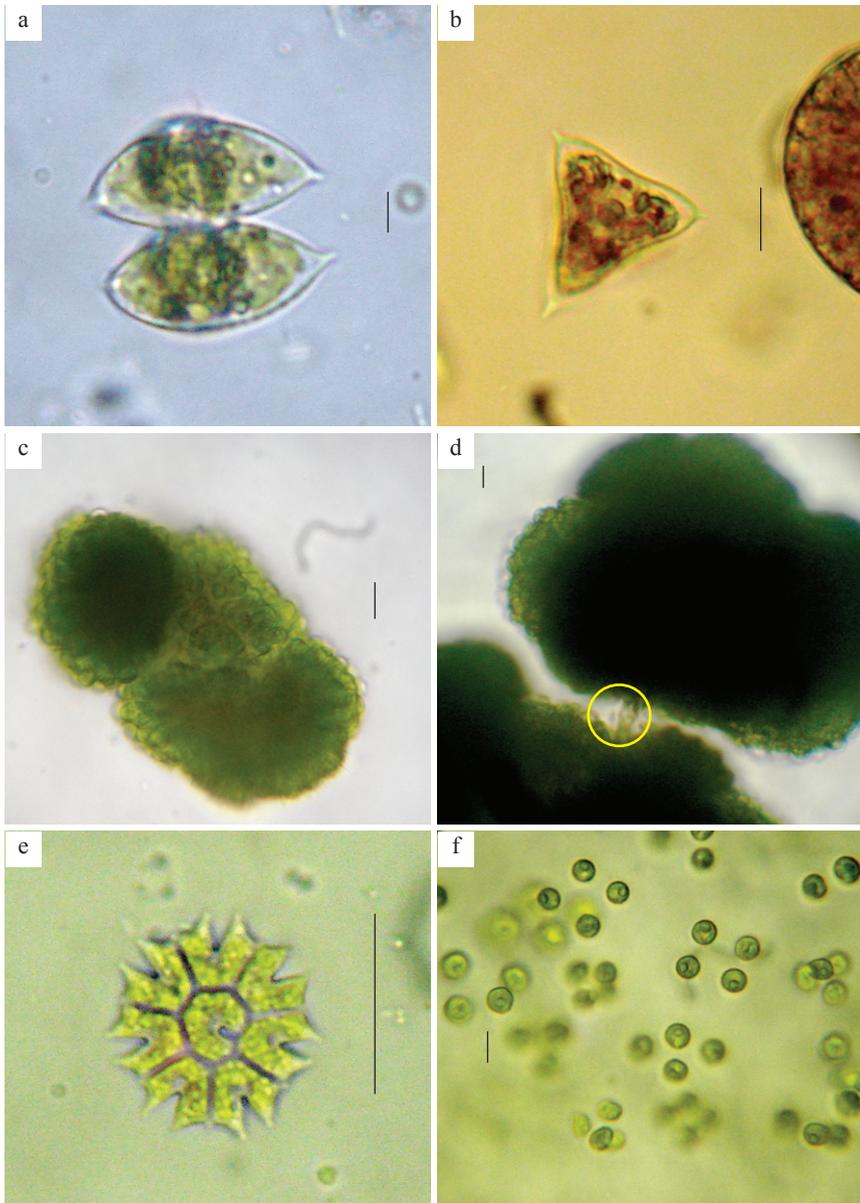
***Euastrum bidentatum*** (Fig. 4f)

Alga de 35-40  $\mu\text{m}$  de largo, 25-29  $\mu\text{m}$  de ancho, istmo de 3-4  $\mu\text{m}$  de ancho. Célula con márgenes laterales divididos en 2 partes por una leve ondulación, zona apical con una profunda incisión central. Constricción media profunda y seno lineal. Pared celular con gránulos marginales. Un cloroplasto por hemisoma con un pirenoide. Se colectó en el perifiton.

**Referencias:** Delgado (1967).

***Staurodesmus dickiei*** (Fig. 5a, b)

Alga unicelular de 33-36,6  $\mu\text{m}$  de largo, 45-47  $\mu\text{m}$  de ancho (con espinas incluidas), istmo de 5-7  $\mu\text{m}$  de ancho, con hemicélulas elípticas, pared celular lisa, márgenes terminados en espinas ligeramente curvadas hacia adentro y con vista apical triangular. Constricción central abierta y profunda. Cloroplastos con



**Fig. 5.** **a.** *Staurodesmus dickiei*. **b.** *S. dickiei* (vista apical). **c.** *Botryococcus braunii*. **d.** *B. braunii* (extensiones de mucilago que unen a dos o más colonias). **e.** *Pediatrum tetras* var. *tetraodon*. **f.** *Chlorella vulgaris*.

un pirenoide por hemisoma. Colectada en el perifiton y plancton.

**Referencias:** Bicudo & Ungaretti (1986), Riehl & Infante (1987), Mirande & Tracanna (2004), Bicudo & Menezes (2005).

**Botryococcus braunii** (Fig. 5c, d)

Alga colonial, constituida por numerosas células densamente distribuidas en abundante mucilago. Puede formar colonias compuestas, que generalmente permanecen unidas mediante extensiones de mucilago. Células ovoides, 6-10  $\mu\text{m}$  de largo, 3-4  $\mu\text{m}$  de ancho. Colectada en el plancton.

**Referencias:** Yacubson (1974), Bicudo & Menezes (2005).

**Pediastrum tetras** var. **tetraodon** (Fig. 5e)

Colonia plana, formada por 8 células que presentan forma de “V” con una incisión abierta en la parte central. La colonia tiene un diámetro de 15-17  $\mu\text{m}$ , células 12-16  $\mu\text{m}$  de largo, 6-8  $\mu\text{m}$  de ancho. Se colectó en el perifiton.

**Referencias:** Bernal (2002), Bicudo & Menezes (2005).

**Chlorella vulgaris** (Fig. 5f)

Alga con células globosas de 5-11  $\mu\text{m}$  de diámetro, solitaria, o en agregados en el interior de una capa de mucilago, formando de 2 a 8 autósporas. Cloroplasto parietal en forma de copa con un pirenoide.

**Referencias:** Taft & Taft (1971), Bicudo & Menezes (2005).

**Pandorina morum** (Fig. 6a)

Colonia esférica u ovoide, de 40-45  $\mu\text{m}$  de diámetro, con células de 11-12  $\mu\text{m}$  de ancho, formada por 8-16 células biflageladas, dentro de una vaina mucilaginoso.

**Referencias:** Yacubson (1980), Mirande & Tracanna (2004).

## EUGLENOPHYTA

**Euglena spirogyra** (Fig. 6b-d)

Célula cilíndrica de 85-110  $\mu\text{m}$  de largo, 11-14,5  $\mu\text{m}$  de ancho, ligeramente



**Fig. 6.** a. *Pandorina morum*. b. *Euglena spirogyra*. c. *E. spirogyra* (detalle de las estriaciones). d. *E. spirogyra* (detalle de los paramilos). e-f. *Lepocinclis salina*.

redondeada en el ápice y puntiaguda en el extremo posterior. Periplasto con ornamentaciones punctiformes en forma de líneas anteroposteriores, ligeramente enrolladas en espiral. Colectada en el plancton.

**Referencias:** Yacubson (1980), Wolowsky (1998), Conforti (1994).

### **Lepocinclis salina** (Fig. 6e, f)

Células planctónicas ovoides de 42-45  $\mu\text{m}$  de largo, 30-35,5  $\mu\text{m}$  de ancho, con un flagelo anterior. Periplasto con estrías espiraladas. Numerosos cloroplastos y gránulos.

**Referencias:** Yacubson (1980), Keppeler *et al.* (1999), Bernal (2002), Bernal *et al.* (2005).

### **Phacus pleuronectes** (Fig. 7a)

Célula acorazonada de 35-38  $\mu\text{m}$  de largo, 27-30  $\mu\text{m}$  de ancho, aplanada dorsiventralmente, con el extremo posterior terminado en un proceso caudal corto. Periplasto rígido con estrías longitudinales, anteroposteriores. Numerosos cloroplastos discoides, cuerpo paramiláceo central en forma de disco, paramilo central de 8,5-13,5  $\mu\text{m}$ . Colectada en el plancton.

**Referencias:** Lampe (1979), Bernal (2002), Salazar (2004).

### **Phacus tortus** (Fig. 7b)

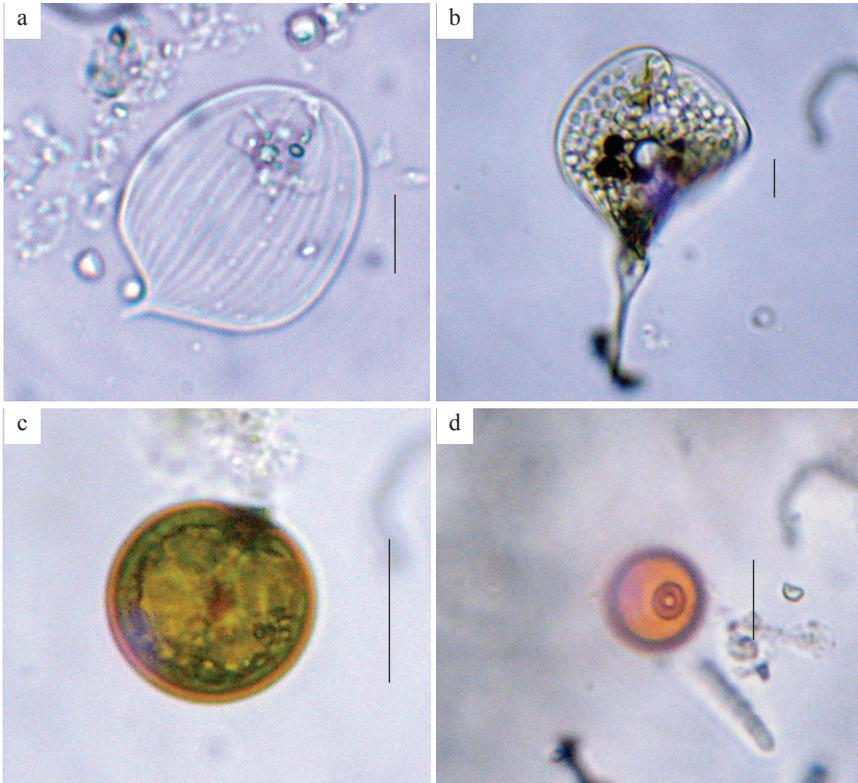
Célula plana enrollada en espiral hacia su parte posterior de 104-110  $\mu\text{m}$  de largo con proceso caudal, 48-60  $\mu\text{m}$  de ancho, proceso caudal 25-39  $\mu\text{m}$ . Periplasto rígido ornamentado longitudinalmente. Apéndice caudal levemente curvo. Cuerpo paramiláceo en forma de disco en la parte media de la célula. Colectada en el plancton.

**Referencias:** Yacubson (1980), Conforti (1994), Giani *et al.* (1999).

### **Trachelomonas volvocina** (Fig. 7c, d)

Célula planctónica de 13-18  $\mu\text{m}$  de diámetro. Lórica esférica, lisa y pardorrojiza. Presenta un engrosamiento en el poro denominado collar. El flagelo es dos veces más largo que la célula.

**Referencias:** Lampe (1979), Yacubson (1980), Conforti (1994), Giani *et al.* (1999), Bernal *et al.* (2005).



**Fig. 7.** a. *Phacus pleuronectes*. b. *P. tortus*. c. *Trachelomonas volvocina*. d. *T. volvocina* (vista apical, donde se observa el collar).

## AGRADECIMIENTOS

El autor agradece al personal del Centro Regional de Investigaciones Ambientales (CRIA), de la Universidad de Oriente (UDO), Nueva Esparta por su colaboración durante los muestreos; a su director Julio Rodríguez, por su valioso aporte en la redacción del manuscrito. De la misma manera agradezco a William Lampe por su revisión crítica y contribución valiosa en la finalización de esta investigación. También agradezco al Prof. Gedio Marín del Departamento de Biología.

## BIBLIOGRAFÍA

Bernal, J. 2002. Taxonomía de microalgas en las riberas del Embalse Clavellinos, Municipio Ribero, estado Sucre, Venezuela. Trabajo de Pregrado. Departamento de Biología, Universidad de Oriente, Cumaná, Venezuela.

- Bernal, J., W. Lampe & M. Cova. 2005. Nuevos registros de microalgas para el estado Sucre, Venezuela. *Acta Bot. Venez.* 28(1): 89-100.
- Bicudo, C. & L. Ungaretti. 1986. *Desmidiás (Zignemaphyceae) da Lagoa-Represa de Águas Belas, rio Grande do Sul, Brasil.* *Revista Brasil. Biol.* 46(2): 285-307.
- Bicudo, C., D. Bicudo, A. Castro & M. Picelli. 1992. Fitoplâncton do trecho médico a represar do rio Paranapanema (Usina Hidrelétrica de Rosana), Estado do São Paulo, Brasil. *Revista Brasil. Biol.* 52(2): 293-310.
- Bicudo, C. & M. Menezes. 2005. *Gêneros de algas de águas continentais do Brasil: Chave de identificação e descrições.* Editora Rima, Santa Paula.
- Conforti, V. 1994. Study of the Euglenophyta from Calmaleao lake (Manaus, Brasil). *Rev. Hydrobiol. Trop.* 27(1): 3-21.
- Delgado, R. 1967. Las desmidiáceas de Cumaná y sus alrededores. Trabajo de Pregrado. Departamento de Biología, Universidad de Oriente, Cumaná, Venezuela.
- Delgado, J., Y. Reverol & L. Sánchez. 2003. *Micrasterias (Desmídiales) de la cuenca baja del río Caura, Venezuela.* *Acta Bot. Venez.* 26(1): 1-13.
- González, A. & W. Riehl. 1992. Estudio taxonómico del fitoplancton del Embalse de Guri, estado Bolívar. *Acta Ci. Venez.* 43: 190-199.
- Giani, A., C. Figueredo & P. Etherovick. 1999. Algas planctónicas do reservatório da Pampulha (MG): Euglenophyta, Chrysophyta, Pyrrophyta, Cyanobacteria. *Revista Brasil. Bot.* 22(2): 107-116.
- Keppeler, E., C.M. Lopes & C.S. Lima. 1999. Ficoflora do Lago Amapá em rio Branco-Acre, I: Euglenophyceae. *Revista Brasil. Biol.* 59(4): 679-686.
- Lampe, W. 1979. Contribución a la taxonomía de las algas de ambientes continentales del Estado Sucre. Trabajo de Pregrado. Departamento de Biología, Universidad de Oriente, Cumaná, Venezuela.
- Lind, E. & A. Brook. 1980. *Desmid of the english lake District.* Freshwater Biological Association Scientific Publication, London.
- Margalef, R. 1961. La vida en los charcos de agua dulce del estado Nueva Esparta. *Mem. Soc. Ci. Nat. La Salle* 21(59): 75-110.
- Mirande, V. & B. Tracanna. 2004. Fitoplancton del río Gastona (Tucumán, Argentina). Cyanophyta, Chlorophyta, Euglenophyta y Rhodophyta. *Iheringia, Ser. Bot.* 59(1): 35-58.
- Riehl, W. & A. Infante. 1987. Desmídias del Embalse de Guri. Venezuela. *Acta Ci. Venez.* 38: 106-121.
- Rodríguez, J., D. López, A. Marcano, J. López, A. Guilarte & J. Barreto. 2008. Composición macroflorística de la laguna El Hato en el Monumento Natural Laguna de Las Marites. VIII Congreso Científico de la Universidad de Oriente. Isla de Margarita, Venezuela.
- Rodrigues, L. & S. Felisberto. 2004. Periphytic desmids in Corumbá Reservoir, Goiás, Brazil: genus *Cosmarium* Corda. *Brazil. J. Biol.* 64(1): 1-13.

- Salazar, C. & S. Guarrera. 2000. *Cosmarium*, *Actinotenium* y *Cosmocladium* (Desmidiaceae, Chlorophyta) asociadas a gramíneas, con la proposición de cuatro nuevos taxa para la ciencia. *Acta Biol. Venez.* 20(3): 1-16.
- Salazar, C. 2004. Euglenophytas pigmentadas asociadas a *Hymenachne amplexicaulis* en una sabana tropical inundable. *Acta Bot. Venez.* 27(2): 101-125.
- Sant'Anna, C., M. Azevedo, P. Senna, J. Komárek & J. Komárková. 2004. Cianobacterias planctónicas do Estado de São Paulo, Brasil: Chroococcales. *Revista Brasil. Bot.* 27(2): 1-20.
- Taft, C. & C. Taft. 1971. The algae of western lake Ontario. *Ohio Biological Survey*. Ohio State University 1(4): 2-163.
- Vegas, T. & W. Riehl. 2001. Contribución al conocimiento de las especies de fitoplancton del Embalse de Guri (Venezuela). *Acta Bot. Venez.* 24(2): 93-132.
- Wolowski, K. 1998. *Taxonomy and environmental studies on Euglenophytes of the Krakow-Czestochowa* (Southern Poland). Institute of Botany, Polish Academy of Sciences, Krakow.
- Yacubson, S. 1969. Algas de ambientes continentales nuevas para Venezuela. (Cyanophyta y Chlorophyta). *Bol. Centro Invest. Biol. Univ. Zulia* 3: 7-87.
- Yacubson, S. 1974. Catálogo e iconografía de Chlorophyta de Venezuela. *Bol. Centro Invest. Biol. Univ. Zulia* 11: 7-143.
- Yacubson, S. 1980. Algas del río Limón y ambientes acuáticos cercanos (estado Zulia, Venezuela). *Bol. Centro Invest. Biol. Univ. Zulia* 14: 1-81.

