TÉCNICAS HISTOLÓGICAS E ULTRAESTRUTURAIS EM ESTUDOS DE ECOFISIOLOGIA PLANCTÓNICA

M. Pastorinho[1], M. L.Pereira[1], I. K. Pai [3], U. Azeiteiro[2], J. Fonseca[2] & F. M. Morgado[1]

1 - Departamento de Biologia, Universidade de Aveiro, 3800 Aveiro, Portugal
2 - IMAR - Laboratório de Zoologia, Universidade de Coimbra, 3030 Coimbra, Portugal
3 - Departamento de Zoologia, Universidade de Goa, India

Pastorinho, M., Pereira, M. L., Pai, I. K, Azeiteiro, U., Fonseca, J. & Morgado, F. M. (2000). Técnicas histológicas e ultraestruturais em estudos de ecofisiologia planctónica. *Revista Biol. (Lisboa)* **18**: 167-176.

Este trabalho é parte de um estudo multidisciplinar e integrado do Estuário do Mondego, por forma a estimar o impacto dos efeitos antrópicos e *forcings* naturais na circulação de matéria e energia. O principal objectivo é a caracterização dos diferentes grupos pelágicos nas vertentes taxonómica, trófica e ecológica. Pretende-se que desta forma sejam avaliados os impactos ambientais na estrutura e funcionamento do ecossistema pelágico, que levem ao desenvolvimento de ferramentas conceptuais e linhas de força para a gestão integrada e sustentada de ecossistemas estuarinos. A aplicação de técnicas histológicas e de microscopia electrónica a espécies chave do zooplâncton, para além do factor inovação que em si próprio encerra, é da maior importância se tivermos presente que a organização interna dos organismos constitui um indicador fiel da influência que o ambiente exerce sobre o comportamento e funcionamento dos ecossistemas. As metodologias descritas permitem a identificação de anomalias/patologias em diversos orgãos dos organismos zooplanctónicos e o eventual estabelecimento de correlações com as actividades antrópicas em presença no estuário. Estas técnicas actuam como complemento do conteúdo bioquímico das espécies chave permitindo a construção de representações esquemáticas e a modelização dos sistemas.

Palavras chave: Histologia, *Acartia clausi, Acartia tonsa, Mesopodopsis slabberi,* impacto humano, estuários.

Pastorinho, M., Pereira, M. L., Pai, I. K, Azeiteiro, U., Fonseca, J. & Morgado, F. M. (2000). Histological and

ultrastructural techniques in plankton ecophysiological studies. *Revista Biol. (Lisboa)* **18**: 167-176.

This study is part of a multidisciplinary and integrated project over the Mondego Estuary-Portugal, which aims to estimate the impact of the anthropic effects and natural forcing in the energy and matter circulation. The main objective is the characterisation of the different pelagic groups in its taxonomic, trophic and ecological components. Trough this is meant to evaluate the environmental impacts in the structure and functioning of the pelagic ecosystem, leading to the development of conceptual tools and guiding lines for the integrated and sustainable management of the estuarine ecosystem. The application of histological and electron microscopic techniques to key species of the zooplankton, besides the innovation that represents in itself, is of the greatest importance, once we take in consideration that the internal organisation of the organisms constitutes a reliable indicator of the influences environment bestows upon the functioning and behaviour of ecosystems. The methods here described allow the identification of anomalies/pathologies in various organs of zooplanktonic organisms and their connection with anthropic activities present in the estuary. These techniques act as a complement to the information obtained by the biochemical composition analysis of these key species allowing the schematic representation and modelling of the systems.

Key words: Histology, *Acartia clausi, Acartia tonsa, Mesopodopsis slabberi,* human impact, estuary.

INTRODUÇÃO

O presente trabalho é parte de um estudo multidisciplinar e integrado do estuário do Rio Mondego de modo a estimar o impacto humano na dinâmica de energia e matéria. Os objectivos primordiais são as caracterizações das componentes pelágicas do ecossistema, a sua taxonomia e biologia trófica, dinâmica e ecologia. Deste modo pretende-se avaliar o impacto ambiental de *forcings* naturais e actividades antrópicas na estrutura e funcionamento do ecossistema pelágico por forma a fornecer um contributo para o desenvolvimento de modelos conceptuais de gestão de ecossistemas estuarinos.

A compreensão, raras vezes tentada, da bioecologia de espécies planctónicas através do recurso à analise da sua estrutura histológica (especialmente no tocante às variações registadas com o evoluir do ciclo reprodutivo) (FREEMAN *et* BRACEGIRDLE, 1977) foi a via escolhida pelos autores para contribuir, ao nível deste compartimento, para a consecução dos objectivos acima formulados, estando presentes neste texto as etapas já realizadas e aquelas que se propõem ainda realizar.

Foram seleccionadas três espécies: *Acartia clausi* Giesbrecht (Arthropoda; Crustacea; Copepoda; Calanoida), *Acartia tonsa* Dana (Arthropoda; Crustacea; Copepoda; Calanoida) e *Mesopodopsis slabberi* Van Beneden (Artropoda; Crustacea; Malacostraca; Misidacea).

Esta selecção deveu-se, no caso dos dois copépodes, ao facto de serem organismos de marcada representatividade em praticamente todas as cadeias tróficas do meio aquático, quer pela posição ocupada nestas cadeias, fazendo a transferência entre os produtores primários do pelagos - os elementos de fitoplâncton - e os níveis superiores -peixes e larvas de peixes planctívoros, para citar somente os mais importantes, quer, facto intimamente relacionado com o anterior, pela sua enorme abundância, geradora de dominância nas comunidades zooplanctónicas onde se inserem, dominância esta que é flutuante consoante as estações do ano (DEEVEY, 1971; TODD *et* LAVERACK, 1991). Para além da sua importância na biomassa planctónica, assumem também uma importância funcional da maior relevância relacionadas com os diferentes regimes alimentares, podendo ser herbívoros ou carnívoros, tendo igualmente sido registada a omnivoria (DEEVEY, 1960) e sofrem predação de peixes planctívoros e predadores invertebrados. A estes aspectos é comumente atribuída a estruturação das populações (BINET, 1977; KLEIN-BRETELER, 1982) e a alternância dos seus padrões típicos de dominância/ausência (que oscila de acordo com gradientes latitudinais) (GAUDY, 1971).

A escolha do misidáceo prendeu-se com o local em estudo –Estuário do Mondego– pois apesar de não ser, de forma alguma de ocorrência tão generalizada como os copépodes é ainda assim a mais abundante das 14 espécies de misidáceos em presença, antevendo-se assim um papel de grande relevância em termos do estabelecimento de interacções tróficas (SILVEIRA *et al,* 1993; AZEITEIRO *et al,* 1999).

Os misidáceos retiveram de forma notória um *facies* primitivo característico dos elementos de maiores dimensões da sua Classe (como, por exemplo, *Palaemon serratus* Pennant), sendo por isso mais facilmente identificáveis que os restantes peracarida (JORGENSEN *et* MATTHEWS, 1970). Podem ser encontrados com frequência em lagunas entre a vegetação subaquática, preferindo, no entanto, canais de água livre em estuários ou o mar aberto. Durante o dia nadam perto do fundo, fixando-se a vegetais aquáticos ou rochas ou constróem túneis nos substratos moles (WEBB *et* WOOLRIDGE, 1990). Durante a noite verifica-se migração em direcção à superfície, fazendo-se que a sua distribuição sob forma de aglomerados ("nuvens"). Em termos alimentares actuam como filtradores ou necrófagos. Sofrem predação principalmente de espécies planctívoras da ictiofauna. Os padrões de reprodução registam ampla variação com a latitude (FOSSA *et al,* 1990; VISCIDO *et al,* 1997) sendo, no entanto, aparentemente contínua na área em estudo (AZEITEIRO, 1999).

MATERIAL E MÉTODOS

Local do estudo - O estuário do Mondego, na costa Oeste de Portugal (40°08'N, 8°50'W), possui uma bacia hidrográfica que drena 6 670 Km^2, tem uma área de 3.3 Km^2 e um volume de 0.0075 Km^3 (GONÇALVES, 1991). A amostragem decorreu no Braço Sul, que possui condições de menor hidrodinamismo, dependendo a circulação da água do ciclo mareal (com uma variação de maré compreendida entre 0.35 e 3.3 m) e do aporte de água doce, cuja principal fonte se situa num afluente do Mondego – o Rio Pranto. As profundidades atingidas variam entre os 2 e os 4 metros. Estas condições levam a um tempo de residência de 9 dias (contra apenas 2 do Braço Norte) (AZEITEIRO *et al*, 1999). O Rio Pranto cujo fluxo foi regulado até há 2 anos por uma comporta, estando agora permanentemente encerrada, é caracterizado por águas baixas e sedimento fino, com grandes fracções de vasa arenosa e elevados teores de matéria orgânica e carbonatos (AZEITEIRO *et al*, 1999).

A captura dos organismos foi realizada com o recurso a uma rede de plâncton com malha de 335 µm e uma rede de epibentos de malha 500 µm, ambas operadas a partir de uma embarcação (com arrastos de, respectivamente, 3 e 5 minutos). O conteúdo dos copos de captura foi depois colocado (com o auxílio de um esguicho com água do local) em contentores de 100 l de capacidade por forma a manter os organismos vivos no decurso do transporte para o laboratório.

Uma vez filtrado em crivos de malha correspondente às redes, o material biológico em estudo foi separado do restante por triagem à lupa. Seleccionam-se organismos para fotografias *in vivo*, lotes de *Acartia tonsa* e *Acartia clausi* e lotes de fêmeas, machos e juvenis de *Mesopodopsis slabberi*. Estes lotes (aproximadamente 50 indivíduos) foram objecto de procedimentos "standard" em termos de técnica histológica sendo, no entanto, de relevar a introdução de modificações pontuais, tornadas necessárias pela especificidade dos organismos em causa, especificidade essa que emerge sobretudo de três factores: reduzidas dimensões, sensibilidade e fragilidade das estruturas e o revestimento por cutícula quitinosa.

A fixação foi realizada em "Solução Bouin" e a desidratação por via de álcoois de crescente graduação, sendo estes líquidos renovados com o auxílio de uma seringa, por forma a causar o mínimo de danos nos organismos.

Na fase de impregnação a principal modificação surge no prolongamento da estadia em estufa da mistura de Benzol e parafina de ponto de fusão 42-44°C, já que passa a 12 horas (na técnica "standard" o período previsto é de 1 hora, tendo este prolongamento a virtude de evitar a desquitinização normalmente necessária a estes organismos quando sujeitos a processos histológicos). De registar que durante toda esta fase há necessidade de colocar o material em caixas de Petri, uma vez que as parafinas sucessivamente utilizadas são de crescente grau de fusão, o que leva à sua pronta solidificação e consequente coalescência e a aderência dos organismos às paredes do frasco (se se mantivesse a sua utilização), obrigando ao manuseio directo, causando-lhes dano, e tornando-os, assim, imprestáveis para a aplicação da técnica.

Os blocos obtidos, contendo entre 4 e 6 organismos consoante as suas dimensões, foram seccionados por meio de um micrótomo LEITZ 1512 (espessura de corte entre 8 e 10 μm).

A coloração foi efectuada com Hematoxilina e Eosina-Phloxina e a subsequente montagem com Eukitt™.

As observações e fotografias foram efectuadas por meio de microscópio NIKON e de máquina NIKON FX-35 DX controlada por módulo NIKON AFX – DX.

As técnicas de Microscopia Electrónica (aqui com modificações decorrentes só das dimensões e sensibilidade dos organismos) foram aplicadas somente a estruturas que, pelas características particulares das suas células constituintes, pudessem fornecer dados (alguns certamente inusitados) acerca da ecofisiologia destas espécies planctónicas. Assim, foram seleccionadas as gónadas de *Acartia tonsa* e *Acartia clausi* e os olhos e gónadas de *Mesopodopsis slabberi*. Neste contexto procedeu-se à recolha dos olhos do misidáceo e ao corte e rejeição de uma porção do cefalotórax, permitindo um acesso facilitado às gónadas (já que a sua grande dimensão, obviamente no contexto e escala presentes, colocaria dificuldades aos cortes em ultramicrótomo).

RESULTADOS

Seguidamente se apresentam resultados concretos da aplicação das técnicas anteriormente descritas, por meio de registos fotográficos obtidos ao Microscópio Óptico (figuras 1 a 6) e ao Microscópio Electrónico de Transmissão (figuras 6 e 7).

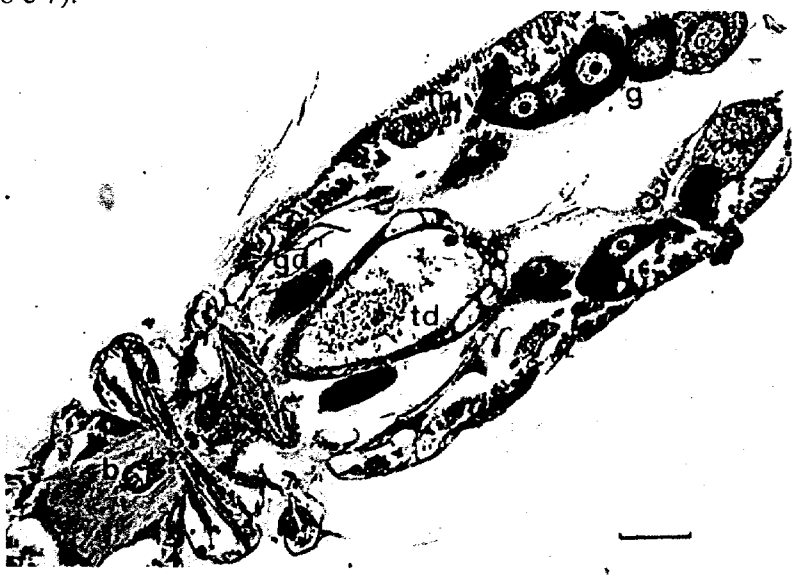

Figura 1. Corte longitudinal de uma fêmea de *Acartia tonsa* Dana, sendo observáveis as massas gonadais (g) com oócitos em diferentes estados de desenvolvimento., tecido muscular (m), glândulas digestivas (gd), tracto digestivo (td) e a boca (b) (HE, x250, escala: 50 μm).

Figura 2. Corte longitudinal das gónadas de *Acartia tonsa* Dana, patenteando oócitos em diferentes fases de desenvolvimento (→) e tecido muscular (m) (HE, x 1000, escala: 20 μm).

Figura 3. Corte longitudinal do cefalotórax de *Mesopodopsis slabberi* Van Beneden, sendo observáveis os músculos extensores (me) músculos flexores (mf) e maxilípedes (p) (HE, x100, escala: 200 μm)

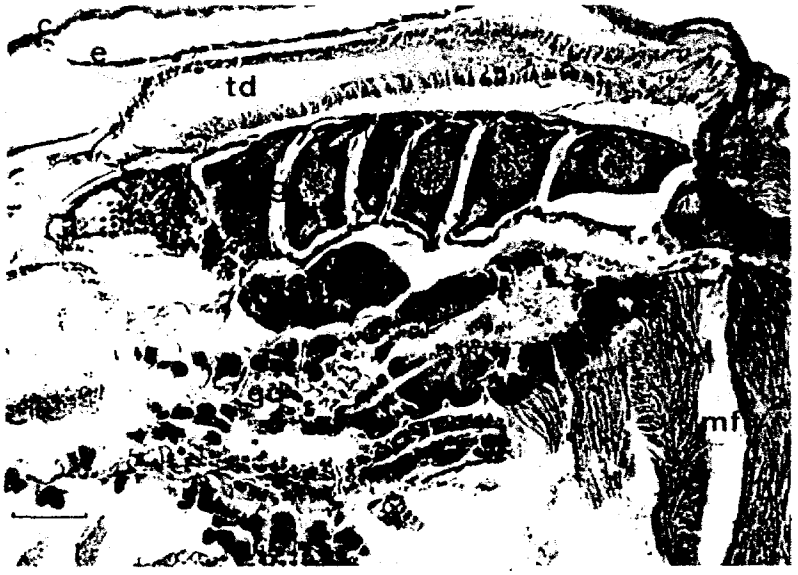

Figura 4. Corte longitudinal de uma fêmea de *Mesopodopsis slabberi* Van Beneden, sendo observáveis a cutícula (c), epiderme (e) (descolada da cutícula devido à fixação), tracto digestivo (td), massa gonadal (g), glândulas digestivas (d) e músculos flexores (mf) (HE, x250, escala: 50 µm).

Figura 5. Corte longitudinal das brânquias (→) de *Mesopodopsis slabberi* Van Beneden (HE, x250, escala: 50 µm).

Figura 6. Corte longitudinal do olho composto de *Mesopodopsis slabberi* Van Beneden. São observáveis: lente cuticular (lc), células da cornea (cc), cone cristalino (ct), vitrellae (vt) (HE, x2500, escala: 10 μm).

Figura 7. Corte transversal do olho composto do misidáceo *Mesopodopsis slabberi* Van Beneden, sendo observável a ultraestrurura das células do cone cristalino (→) (TEM, x7510, escala: 1 μm).

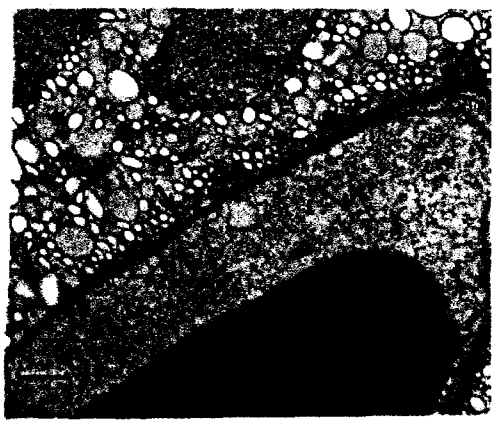

Figura 8. Corte transversal do olho composto do misidáceo *Mesopodopsis slabberi* Van Beneden, sendo observável a ultraestrurura do rhabdoma (rh) e células retinulares (→) (TEM, x4550, escala: 2 μm).

DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

A insuficiência do número de amostragens até agora realizadas não permite, neste momento, a apresentação de elevado número de resultados o que condiciona o alcance de qualquer conclusão.

A técnica utilizada foi afinada a partir da metodologia "standard" pré-existente de modo a adequá-la aos organismos estudados.

A obtenção de lâminas e a aplicação da técnica fotográfica, permitindo o estabelecimento de um registo da evolução das gónadas dos organismos ao longo do seu ciclo reprodutivo conjuntamente com o cruzamento com os dados "clássicos" da ecologia, permitirão fazer uma avaliação sob a perspectiva histológica, das razões mais comumente apontadas para as variações nos ciclos reprodutivos dos organismos, sejam elas de predação (GAUDY, 1972; GREENWOOD, 1981; KLEIN-BRETELER, 1982; FOSSA *et* BRATERGARD, 1990; IANORA *et* BUTINO, 1990; IANORA, 1990; WEBB *et* WOOLRIDGE, 1990), dormência (IANORA *et* BUTINO, 1990) ou outras (VISCIDO *et al*, 1997).

A determinação morfométrica das dimensões gonadais, em correlação com as dimensões somáticas médias das coortes de proveniência, permitirá o estabelecimento de relações estatísticas com a criação de índices relevantes para a identificação de estágios sexuais dos organismos em estudo.

O escrutínio de modificações e/ou patologias (por microscopia óptica e eventual pormenorização por microscopia electrónica) na organização interna dos organismos e o estabelecimento de relações causa/efeito com actividades antrópicas e/ou pressões ambientais, fornecem-nos um instrumento de monitorização/avaliação ao nível celular de eventuais perturbações nos ecossistemas. Deste modo esta abordagem pode funcionar como detector precoce ou indicador da extensão dos impactos à escala celular.

A integração destes estudos com a química e bioquímica das espécies chave poderá contribuir para o melhor conhecimento da estrutura e funcionamento dos sistemas em análise.

AGRADECIMENTOS

Aos revisores pelas sugestões apresentadas. Á Bióloga Carla Quintaneiro pela revisão do texto final.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AZEITEIRO, U. .M. M., JESUS, L. & MARQUES, J.C. (1999). Distribution, population dynamics, and production of the suprabenthic mysid *Mesopodopsis slabberi* in the Mondego Estuary, Portugal. *Jour. of Crust. Biology,* 19(3): 498-509.

BINET, D. (1977). Cycles biologiques et migrations ontogeniques chez quelques copépodes pelagiques des Eaux Ivoiriennes. *Cah. O.R.S.T.O.M., ser. Oceanogr.*, vol. XV, nº 2:111-138.

DEEVEY, G. B. (1960). Relative effects of temperature and food on seasonal variations in length of marine copepods in some Eastern American and Western European waters. *Bull. Bingham Oceanogr.* Coll. XVII: 54-86.

DEEVEY, G. B. (1971). The annual cycle in quantity and composition of the zooplankton of the Sargasso Sea off Bermuda. I. The upper 500 m. *Limnology and Oceanography.* Vol.16 (2): 219-240.

FREEMAN, W.H. & BRACEGIRDLE, B. (1971). *An atlas of invertebrate structure.* Heinemann Educational Books, London.

FOSSA, J. H, BRATTEGARD (1990). Bathymetric distribution of mysidacea in fjords of western Norway. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* Vol 67: 7-18.

GAUDY, R. (1971). Contribution a l'estude du cycle biologique des copepodes pelagiques du golfe de Marseille. 1- L'environnement physique et biotique et la composicion de la population de copepodes. *TETHYS* 3 (4): 921-942.

GREENWOOD, J. G. (1981). Occurences of congeneric pairs of *Acartia* and *Pseudodiaptomus* species (Copepoda, Calanoida) in Moreton Bay, Queensland. *Estuarine Coastal and shelf Science.* VI: 591-596.

GONÇALVES, F. J. (1991). *Zooplâncton e ecologia larvar de crustáceos decápodes no Estuário do Rio Mondego.* – Tese de Doutoramento, FCT, Universidade de Coimbra, Portugal.

IANORA, A. & BUTINO, I. (1990). Seasonal cycles in population abundances and egg production rates in the planktonic copepods *Centropages typicus* and *Acartia clausi. Journal of Plankton Research* Vol 12 no.3: 473-481.

JORGENSEN, G. & MATTHEWS, J. B. L. (1970). Ecological studies on the deep-water pelagic community of Korsfjorden, Western Norway. *SARSIA* 59: 67-84.

KLEIN-BRETELER, W. C. M. (1982). The life stages of four pelagic copepods (Copepoda: Calanoida), illustrated by a series of photographs. *Neth. Inst. Sea Res., ser.*6: 1-32.

ROSE, M. (1933). *Faune de France. Copepodes pelagiques.* Féderation Française des Sciences Naturelles, Paris.

SILVEIRA, S. M. M.; NOGUEIRA, A.; RIBEIRO, R.; GONÇALVES, F.; MARQUES, J.C.; & SOARES, A.M.V.M. (1993). Crescimento e reprodução de *Mesopodopsis slabberi* Van Beneden (Crustacea: Mysidacea) no estuário do Rio Mondego. *Bol. UCA. U. Algarve, UCTRA,* vol.1:444-452.

TODD, C.D. & LOVERACK, M. S. (1991). *Coastal Marine Zooplankton: a practical manual for students.* Cambridge University Press, Cambridge.

VISCIDO, S. V., STEARNS, D. E. & ABLE, K. W. (1997). Seasonal and spatial patterns of an epibenthic decapod crustacean assemblage in NorthWest Atlantic continental shelf waters. *Estuarine Coastal and Shelf Science* 45:377-392.

WEBB, P. & WOOLDRIDGE, T. H. (1990). Diel horizontal migration of *Mesopodopsis slabberi* (Crustacea: mysidacea) in Algoa Bay, Southern Africa. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* Vol 62: 73-77.