



REIMAR SCHADEN

MANUAL DE TÉCNICAS PARA A PREPARAÇÃO DE COLEÇÕES ZOOLOGICAS

10. ROTIFERA

REIMAR SCHADEN

10. ROTIFERA

REIMAR SCHADEN

2. INTRODUÇÃO

Os Rotíferos formam um grupo de animais ainda muito pouco estudado pelos zoólogos brasileiros, malgrado o grande interesse que apresentam nos mais variados aspectos de sua sistemática e bionomia. Deve-se isto, entre outros motivos, provavelmente ao difícil manuseio destes organismos microscópicos e às técnicas, às vezes demoradas, para a sua preparação.

Para os que se iniciam neste táxon, recomenda-se um aprofundado estudo de sua anatomia e seu sistema em um dos conceituados trabalhos que versam sobre estes assuntos, por exemplo os de Remane, 1929/33, Hyman, 1951, Voigt, 1956/57, Beauchamp, 1965, Donner, 1965, e Koste, 1978, entre outros. Estes tópicos não serão abordados neste capítulo, que ficará restrito a indicações e recomendações sobre a metodologia do estudo dos Rotíferos, por vezes aplicáveis também a tratamento dispensado a outros invertebrados microscópicos aquáticos (Protozoários, Nemátodos, Tardígrados, Cladóceros, Copépodos, etc.).

Como a grande maioria das espécies de Rotíferos é muito sensível a qualquer influência externa, a mínima alteração das condições ambientais provoca uma imediata e violenta contração do seu corpo. Fixados em tal condição, aqueles Rotíferos desprovidos de lórica são praticamente indetermináveis, tornando-se necessário o exame de material vivo. Por outro lado, os caracteres úteis para a determinação das formas loricadas encontram-se em grande parte na carapaça, sendo melhor evidenciados quase sempre quando os animais estão contraídos. Assim, conforme o material a ser estudado ou as finalidades a que se propõe um trabalho, o pesquisador terá que proceder à observação vital ou ao exame de material fixado.

Em qualquer caso, é imprescindível o uso de uma lupa binocular e de um microscópio de grande aumento, provido de equipamento de contraste de fase. Os demais apetrechos e instrumentos necessários ao estudo dos Rotíferos serão mencionados e descritos nos diversos tópicos do capítulo.

2. OCORRÊNCIA

Os Rotíferos constituem um grupo taxonômico eminentemente límnico, havendo muito poucas espécies no mar ou na água salobra, assim como epizóicas ou parasíticas. Os mais diferentes ambientes aquáticos e semiaquáticos são por eles habitados.

Nos corpos d'água lênticos, muitos são integrantes importantes do plâncton, do bentos, principalmente o errante, do perifíton e do perilíton, como também do psâmon. Em ambientes lóticos, não ocorrem apenas nos remansos, mas mesmo em locais de correnteza mais rápida, sobre as hidrófitas, por exemplo.

Quanto aos microlimnótopos, são encontrados não somente em poças temporárias, mas também nos acúmulos de água pluvial, em ocos de pau, nas axilas de folhas (tais como os formados em Bromeliáceas), e em olhos d'água

dos pântanos, etc. Certas espécies são habitantes regulares da água que se mantêm entre os folíolos de musgos e os talos de líquens, e do solo úmido.

Há, dentre os Rotíferos, alguns que são encontrados em condições ambientais extremas, como por exemplo sobre a superfície da neve e em águas termais.

Esta diversidade de habitats em que ocorrem os Rotíferos, e a decorrente multiplicidade de variações morfológicas e adaptativas que apresentam, exigem um considerável número de técnicas e métodos para a sua coleta, preparação, cultura e estudo.

3. COLETA

Para a coleta de Rotíferos pelágicos, deve-se dispor de uma rede de plâncton, confeccionada com gaze de seda (para peneira de moinho) de malha n.º 25, ou, melhor ainda, com tecido de "nylon" ou outra fibra sintética, de malhas suficientemente finas (cerca de 40 μm). É uma rede cônica, com a abertura maior ("boca") sustentada por uma argola de metal, e com um frasco de coleta afixado á extremidade posterior (fig. 1). A rede pode variar de tamanho, obedecendo, de acordo com Schwoerbel, 1966, à proporção 1 : 4 entre o diâmetro da boca e o comprimento; usualmente a boca tem 10 a 30 cm de diâmetro, e o comprimento da rede é de 40 cm a 1,2 m.

Redes de porte maior são puxadas por meio de um cordão trançado, de algodão encerado ou "nylon", preso à argola da boca. São jogadas da margem ou de dentro de um barco, e arrastadas lentamente. Redes menores podem ter, em substituição ao cordão, um cabo (vara ou haste) fixado à argola da boca; se for muito comprido, este cabo poderá ser telescópico, ou formado de diversos pedaços atarraxados ou encaixados entre si. Com este dispositivo poderão ser tomadas amostras de regiões um pouco mais profundas de um lago. Streble & Krauter, 1973, recomendam girar neste caso o cabo para fechar a rede, antes de içá-la. Lincoln & Sheals, 1979, apresentam uma rede de plâncton com um simples mas eficiente mecanismo de fechamento (fig. 2) : um segundo cordão, além do de tração, passa por uma série de argolas presas circularmente ao redor da rede, aproximadamente a 1/3 da sua extensão; quando do içamento, um simples puxão neste segundo cordão fará com que a rede se feche.

O frasco de coleta da rede, de metal ou plástico, deve ter, de preferência, um dispositivo que permita uma rápida retirada de seu conteúdo, para maior comodidade de manuseio (fig. 3). Há redes comerciais providas de frasco com torneirinha, extremamente práticas. Se uma tal rede não estiver disponível, deve-se dar preferência a uma com frasco destacável ou com fundo fechado com rolha ou tampa atarraxada; neste casos, é recomendável que a rolha ou tampa esteja presa a um barbante com a outra extremidade amarrada ao próprio frasco, mais acima, ou na argola da rede; evitam-se, assim, desagradáveis surpresas devidas à perda de rolha ou tampa.

Conforme as finalidades do estudo, a rede deve ser arrastada vertical ou horizontalmente. Para fins de estudos comparativos, é necessário que se use sempre redes com a mesma abertura de malha. Quando, em uma excursão, não se dispõe de um número suficiente de redes, uma para cada corpo d'água examinado, deve-se ter a precaução de lavá-las muito bem com água, antes e após cada coleta. No laboratório, as redes devem ser lavadas imediatamente após a volta da excursão, com água e detergente neutro, e penduradas livremente, no escuro, para secagem.

Os Rotíferos que ocorrem na água do cinturão de macrófitas, entre os vegetais, não podem ser coletados diretamente com uma rede de plâncton sem que ocorra mistura com formas do perifíton; um recipiente de tamanho apropriado, de 3 a 5 litros talvez, de boca larga, serve para retirar a água superficial desta zona, que então é coada através de uma pequena rede de plâncton. Obtém-se, assim, suficiente quantidade de material para estudo.

O transporte das amostras vivas para o laboratório faz-se adequadamente em frascos de plástico (polietileno) de pelo menos 100 cm^3 de volume. Para evitar-se a asfixia dos animais, estes frascos devem ser enchidos até no máxi-

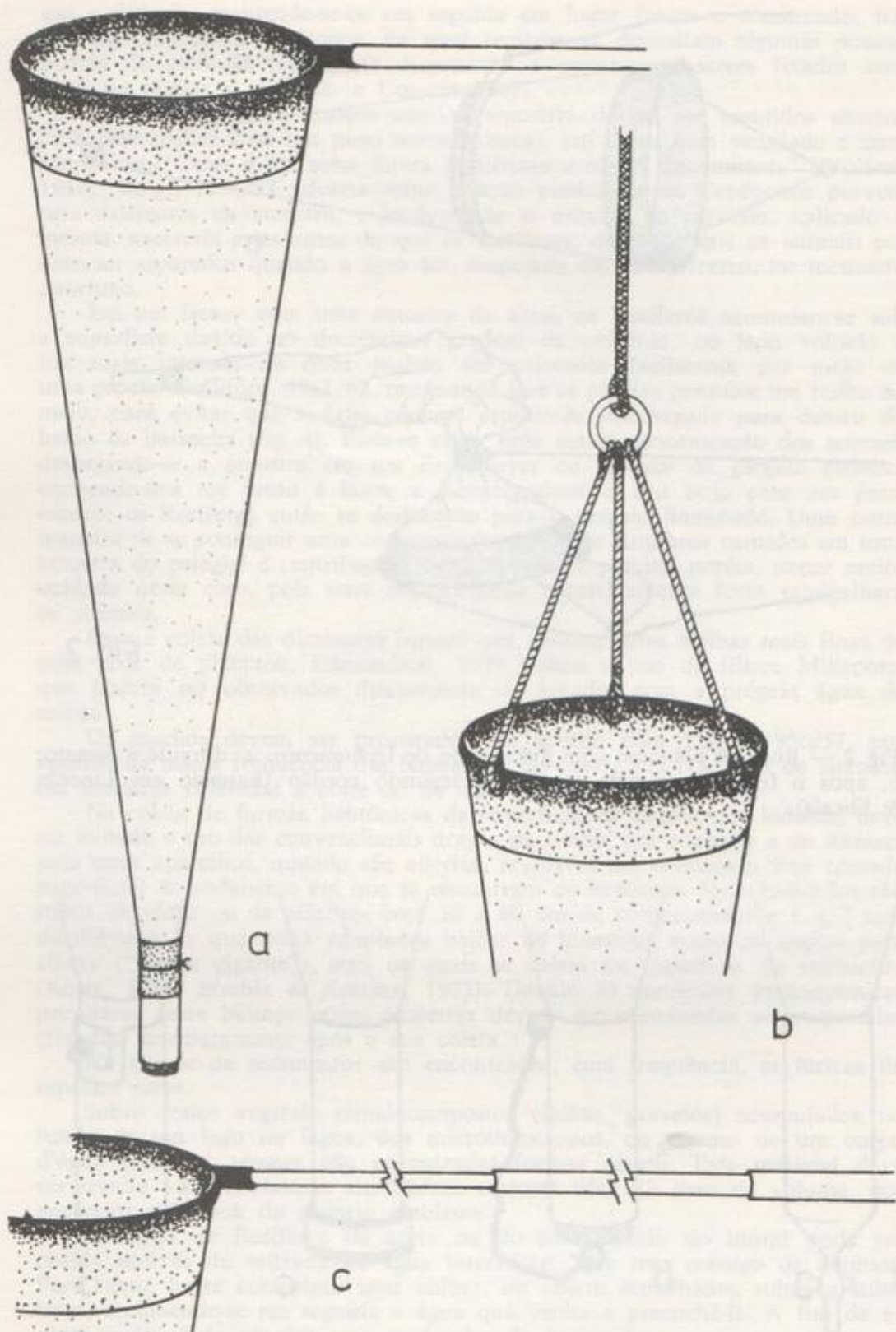


Fig. 1

Fig. 1 — Redes de plâncton, com colarinho de tecido ao redor da argola da boca: a. com cabo fixo; b. com cordão; c. cabo telescópico.

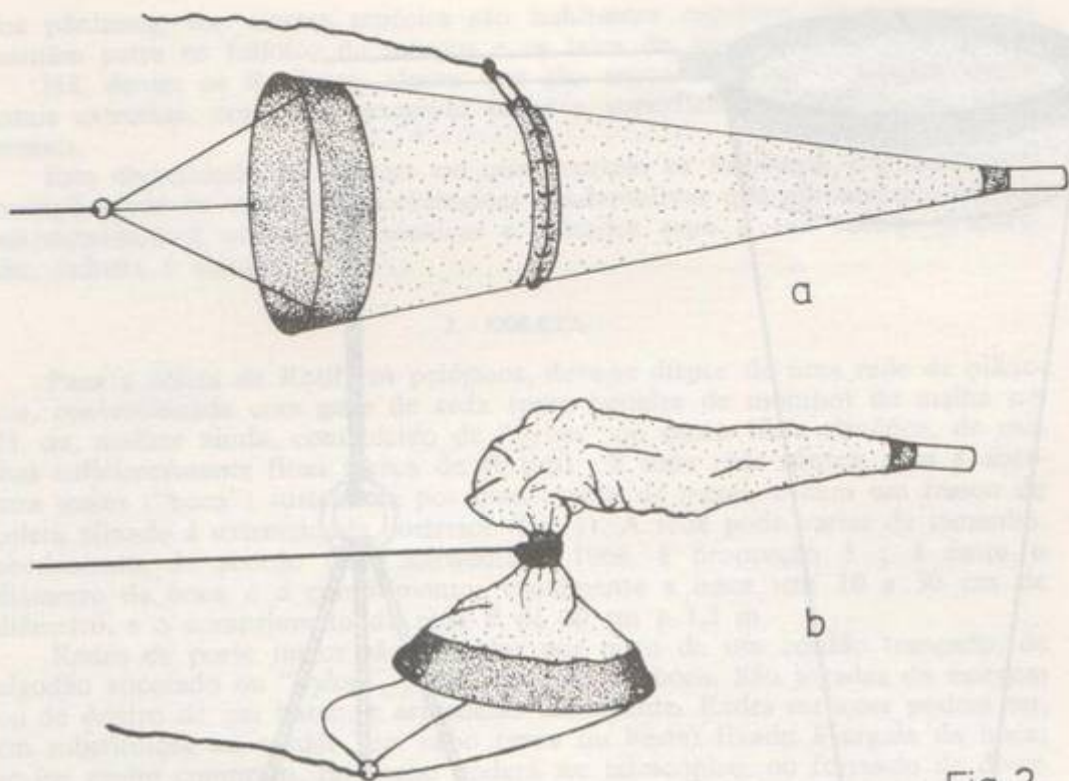


Fig. 2

Fig. 2 — Rede de plâncton com mecanismo de fechamento: a. durante o arrasto; b. após o fechamento pela tração no segundo cordão (baseado em Lincoln & Sheals).

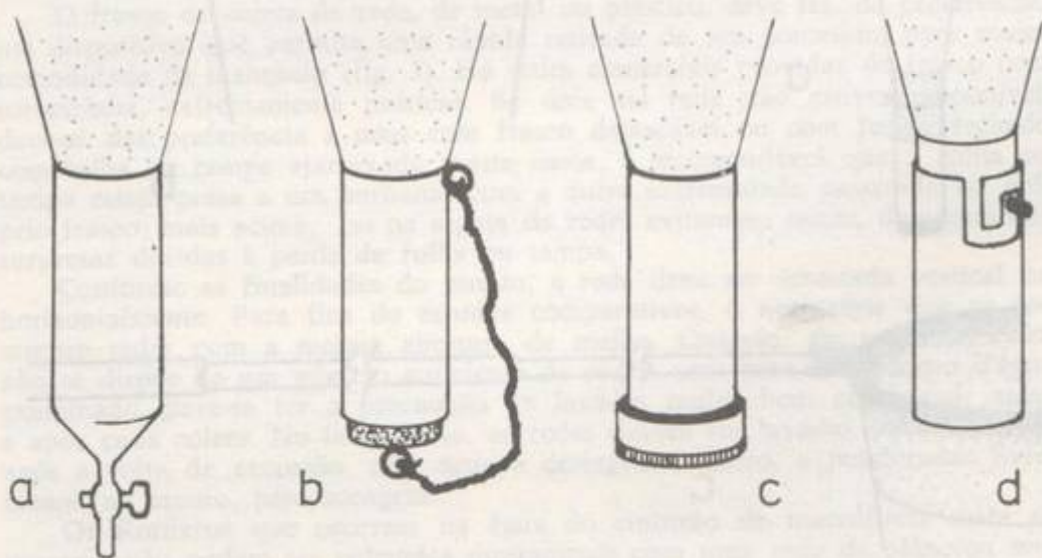


Fig. 3

Fig. 3 — Frascos de coleta de redes de plâncton: a. com torneirinha; b. com rolha; c. com tampa atarraxável; d. em baioneta.

mo a metade, mantendo-se-os em seguida em lugar fresco e sombreado, talvez em uma caixa de isopor, na qual também se depositam algumas poucas pedras de gelo. O tratamento dispensado a amostras a serem fixadas será visto no tópico 8 (Fixação e Conservação).

No laboratório, os frascos com as amostras devem ser mantidos abertos (cobertos apenas com um pano sobre a boca), em lugar bem ventilado e com luz difusa. "Calor e luz solar direta significam a morte dos animais" (Wulfert, 1969). Voigt, 1956/57 adverte sobre a ação predatória de Copépodos porventura existentes na amostra, e lembra que o dióxido de carbono, aplicado à mesma, anestesia estes antes do que os Rotíferos, de modo que os animais podem ser separados quando a água for despejada em outro frasco, no momento oportuno.

Em um frasco com uma amostra de água, os Rotíferos acumulam-se sob a superfície devido ao decréscimo gradual de oxigênio, no lado voltado à luz mais intensa, de onde podem ser coletados facilmente por meio de uma pipeta. Galliford, 1961/62, recomenda que as pipetas possuam um bulbo ao meio, para evitar que a água com os espécimes seja sugada para dentro do balão de borracha (fig. 4). Pode-se obter uma maior concentração dos animais despejando-se a amostra em um Erlenmeyer ou garrafa de gargalo estreito, enchendo-se-a até junto a boca, e escurecendo-se o seu bojo com um pano escuro; os Rotíferos então se deslocarão para o gargalo iluminado. Uma outra maneira de se conseguir uma concentração maior de Rotíferos contidos em uma amostra do pelagial é centrifugá-la brandamente; é preciso, porém, tomar muito cuidado neste caso, pois uma centrifugação excessivamente forte esmigalhará os animais.

Para a coleta das diminutas formas que passam pelas malhas mais finas de uma rede de plâncton, Edmondson, 1959 indica o uso de filtros Millepore, que podem ser observados diretamente ou lavados com a própria água de coleta.

Os machos devem ser procurados, de acordo com Voigt, 1956/57, por ocasião da maior frequência das fêmeas ou da ocorrência dos ovos de latência, em amostras coletadas à noite ou de madrugada.

Na coleta de formas bentônicas da superfície de sedimentos lodosos, deve ser evitado o uso das convencionais dragas de fundo, por exemplo a de Ekman, pois estes aparelhos, quando são abertos, revolvem em demasia a fina camada superficial do sedimento em que se encontram os Rotíferos. Mais indicados são tubos de vidro ou de plástico, com 30 a 60 cm de comprimento e 6 a 7 mm de diâmetro, a que estão adaptados balões de borracha, como os usados para clister ("pipeta gigante"), com os quais se coleta na superfície do sedimento (Koste, 1978; Streble & Krauter, 1973). Devido às condições limnoquímicas peculiares deste biótopo, estas amostras devem ser examinadas ou preparadas (fixadas) imediatamente após a sua coleta.

No exame de sedimentos são encontrados, com frequência, as lóricas de espécies raras.

Sobre restos vegetais semidecompostos (folhas, gravetos) acumulados no fundo de um lago ou lagoa, dos microlimnótopos, ou mesmo de um corpo d'água corrente, sempre são encontradas formas sésseis. Este material deve ser levado ao laboratório em frascos maiores (de 1/2 litro de volume, por exemplo), em água do próprio ambiente.

A fauna de Rotíferos da areia ou do lodo úmido do litoral pode ser obtida através da retirada de água intersticial, que traz consigo os animais. Para tanto, basta comprimir uma colher, ou objeto semelhante, sobre o substrato, recolhendo-se em seguida a água que venha a preenchê-la. A fim de se obter material de porções mais profundas do higropsâmon, cava-se um buraco até o lençol freático, e deixa-se passar a água acumulada, juntamente com eventual detrito, por uma rede de plâncton. Uma outra técnica consiste em se retirar uma coluna do substrato por meio de tubos, que, quando socada sobre uma base firme, desprenderá grande parte da água intersticial na superfície, e que poderá ser pipetada diretamente.

Galliford, 1961/62, aplica a seguinte técnica para obter Rotíferos que vivem na areia do fundo de um corpo d'água: em um frasco é coletada a amostra

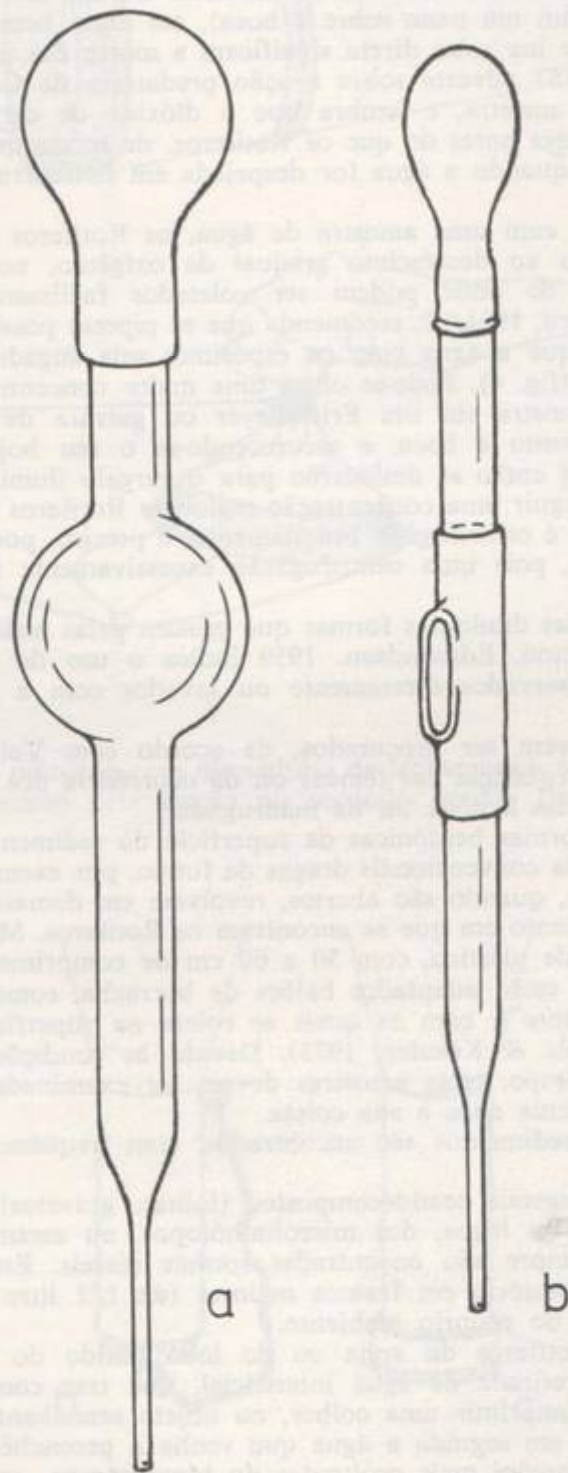


Fig. 4

Fig. 4 — Pipetas: a. com bulbo; b. de Spemann.

do substrato, e, em uma segunda garrafa, uma suficiente quantidade de água do ambiente; no laboratório, esta última é muito bem filtrada, e acrescentada então à amostra, que é agitada vigorosamente durante alguns minutos; logo após a deposição da areia, a água sobrenadante é despejada em um outro frasco, e o seu conteúdo examinado.

Para obtenção da rica fauna que existe sobre as macrófitas (perífíton), estas devem ser colhidas com auxílio de um gancho apropriado (fig. 5), que as arrancará do fundo, ou de uma faca, afixada talvez a uma vara curta, com a qual se cortará os vegetais na profundidade desejada. Este material deve ser colocado, inteiro ou em pedaços maiores, em recipientes grandes, de boca larga, com suficiente água do próprio ambiente, e levado ao laboratório para exame direto. Pode-se também exprimir os vegetais ou agitá-los vigorosamente em água do local de que foram retirados, e passá-la por uma rede de plâncton. Se o caminho até o laboratório não for muito longo, pode-se transportar as hidrófitas isoladamente em sacos plásticos, com alguma umidade; porém, é necessário colocá-las em água do local de coleta imediatamente após a chegada.

As massas gelatinosas que cobrem vegetais submersos e a superfície inferior de folhas flutuantes, ou pedras e madeira submersas, devem ser raspadas cuidadosamente com uma espátula de madeira, ou retiradas com auxílio de um pincel mole. Os tapetes de algas verdes e as barbas de lodo cinzento encontrados nos rios são levados ao laboratório tal qual são com suficiente quantidade de água local.

Amostras de musgos, líquens, serapilheira e solo podem ser colhidas e transportadas diretamente em sacos plásticos, com um pouco de umidade. Devem ser examinadas em tempo relativamente breve, de preferência; porém, se forem mantidas em ambiente fechado, com sua umidade natural e eventuais acréscimos de algumas gotas de água fervida, resistirão durante algum tempo (dias a poucas semanas), podendo ocorrer uma sucessão de espécies. Muitos dos Rotíferos aí encontrados sobrevivem a períodos maiores de seca, em estado de anabiose. Assim, podem ser reavidos de musgo estocado e seco, embebendo-se o material bruto em água fervida (água "mole"), durante algumas horas, e agitando-se-o vigorosamente em seguida na mesma. Pode-se isolar Bdelóideos, esmigalhando e peneirando-se musgo seco, e retirando-se, com uma agulha umedecida, os pequenos grumos avermelhados ou marrom-dourados que aí se encontram; transferidos para uma gota de extrato aquoso de solo ou folhas secas, os animais sairão do estado de anabiose em que permaneciam (Janson, 1893 in Voigt, 1956/57). Recomenda-se a coleta de Bdelóideos de musgos após períodos de seca, quando os animais apresentam maior intensidade reprodutiva (Donner, 1951 in Voigt 1956/57).

Em sendo as diversas formas de ovos elementos importantes para a caracterização taxonômica de muitas espécies, a sua coleta e observação, juntamente com as dos próprios espécimes, não devem ser descuidadas. Em qualquer situação em que apareçam, deve-se dedicar-lhes especial atenção.

Não se deve jamais deixar de anotar, durante ou imediatamente após qualquer coleta, os dados de coleta e ambientais.

4. OBSERVAÇÃO VITAL

Sempre que possível, deve-se dar preferência ao estudo de espécimens vivos sobre o de fixados. Não apenas a identificação taxonômica de Rotíferos iloricados exige a observação vital, como também freqüentemente o estudo de sua anatomia, pois os animais fixados estão muitas vezes contraídos de tal forma que não permitem chegar a conclusões suficientemente seguras sobre a sua real estrutura; "O leve tremor dos órgãos internos permite delimitá-los melhor, e os animais são totalmente transparentes apenas em vida" (Donner, 1966). Além disso, a quase totalidade das manifestações vitais e da bionomia praticamente só pode ser observada em animais vivos, por exemplo a locomoção, a alimentação, a construção de envoltórios e abrigos, os fenômenos reprodutivos, etc. Por esses motivos, as amostras devem ser examinadas o mais depressa possível após a coleta.

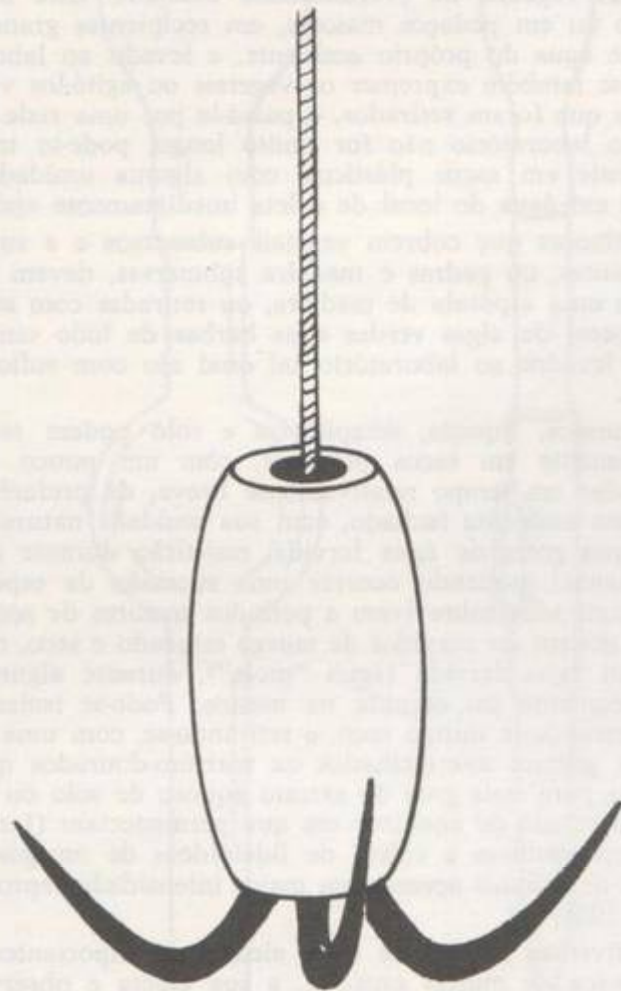


Fig.5

Fig. 5 — Gancho para coleta de hidrófitas (baseado em Galliford)

O exame microscópico de material vivo requer alguns cuidados especiais, em virtude da grande sensibilidade dos Rotíferos, principalmente os iloricados, às variações das condições ambientais. Geralmente contraem-se fortemente quando colocados entre lâmina e lamínula, exigindo muita paciência do observador, principalmente para o exame de animais totalmente distendidos. Bdelóideos contraídos sob a lamínula podem ser levados a uma distensão completa durante curto tempo pela adição de uma pequena quantidade de hidróxido de potássio (Voigt, 1956/57).

Para a observação de espécimes vivos à lupa ou ao microscópio, é recomendável o uso de vidros de relógio ou lâminas escavadas. Para o exame mais pormenorizado, os animais devem ser isolados em lâminas de microscopia comuns, e cobertos com lamínula. O isolamento pode ser feito simplesmente com uma convencional pipeta de ponta fina, ou uma pipeta de Spemann (fig. 4); esta última possui uma abertura lateral coberta por um tubo de borracha fina passado sobre o corpo da pipeta, de modo que, com leves pressões digitais, pode-se sugar quantidades mínimas de água com material de exame, transferindo-se o animal para uma gota previamente depositada na lâmina. Frequentemente ocorre que os animais permanecem aderidos à parede interna da pipeta, sendo aconselhável então "lavá-la" diversas vezes com a própria água da gota. Excesso de água pode ser retirado por meio de tiras de papel de filtro; isto deve ocorrer concomitantemente à observação pelo instrumento óptico, para verificar-se quando o animal está levemente comprimido, o que dificulta a sua locomoção e facilita o exame. As lamínulas podem ser providas com pezinhos de cera ou plastilina, para evitar o esmagamento dos animais, mas há o inconveniente de se imobilizar as lamínulas até certo grau. Evita-se desde o início o esmagamento dos animais através do controle do tamanho da gota d'água na lâmina: se esta for muito pequena, haverá também inclusão de bolhas de ar, além do esmagamento dos animais, se muito grande, estes nadarão para o excesso de água fora da lamínula. Wulfert, 1969, Donner, 1966 e Koste, 1978 aconselham o uso de lâminas maiores (4 x 8 cm), que permitem um deslocamento mais fácil das lamínulas.

Em qualquer caso, deve-se proceder a um cuidadoso exame também do detrito depositado no fundo do frasco de coleta.

As espécies do perifíton podem ser observadas, à lupa binocular, diretamente sobre pedaços cortados do substrato vegetal, colocados em vidro de relógio.

Inicialmente deve ser averiguado o aspecto normal e característico do animal em movimento e em repouso, assim como a forma geral do corpo. Nos Monogononta, atentar para a eventual ocorrência de uma coloração natural de todo o animal ou de alguma de suas partes, estrutura da coroa e de seus órgãos sensoriais, formação de aurículas, posição e forma de antenas dorsal e lateral, ocorrência de antena caudal, estrutura do pé, posição, forma e cor da mancha ocelar, ocorrência de glândulas subcerebral e salivares, forma do órgão retrocerebral, de elementos acessórios do mástax, de apêndices estomacais, etc. (Voigt, 1956/57).

A observação da coroa ciliada é a mais difícil de ser conseguida, pois este órgão é o primeiro a se contrair e o último a se expandir, além de estar constantemente em movimento; às vezes permanece expandida apenas por segundos. Oferta de alimento, leves batidas na preparação ou iluminação mais intensa podem ajudar em alguns casos.

No estudo do trato digestivo, podem ocorrer dificuldades na visualização de suas partes, principalmente nos Habrotrochidae, devidas à estrutura do estômago. Nesta família, segundo Donner, 1966, "um pequeno tubo posterior ao mástax pode causar confusão, o tubo estomacal verdadeiro atinge a porção terminal do tronco". O autor recomenda alimentar os animais com grânulos de carmim, que porém nem sempre são aceitos. A fim de não confundir as pílulas alimentares dos Habrotrochidae com as bolotas de substância de reserva armazenadas na substância viva, o mesmo procedimento com carmin pode auxiliar; também a eventual observação de pílulas eliminadas ajuda a resolver a questão. Uma leve pressão sobre a lamínula pode tornar-se necessária.

A observação dos órgãos de fixação (dedos e discos adesivos) pode ser dificultada pelo freqüente tamanho diminutivo destas estruturas, ou o curto tempo de sua expansão. Neste caso, a maneira mais apropriada é exercer-se uma forte pressão sobre o animal, o que o induzirá a uma reação de fuga e conseqüente expansão de seus órgãos fixadores.

A intensidade dos movimentos de locomoção dos Rotíferos pode ser diminuída pelo acréscimo de algum agente que aumente a densidade do meio, como a muscilagem de marmelo; para tanto, deixar embeber 4 g de sementes de marmelo em 100 g de água. Um outro agente viscoso conveniente para diminuir a movimentação dos animais é a metil-celulose, aplicada sob forma de um anel sobre a lâmina, e no meio do qual se deposita uma gota d'água com os Rotíferos concentrados. Cobertos com lamínula, muitos espécimes ficarão em breve imobilizados junto ao anel (Edmondson, 1959). Bons resultados também foram conseguidos para muitas espécies por Edmondson, 1950, submetendo a amostra a uma centrifugação de 670 G durante 5 minutos, que fez com que os espécimes permanecessem vivos, com coroa distendida, sem movimento ciliar, e com o mástax em função. Contudo, a parada total dos animais só é conseguida efetivamente através da aplicação de narcóticos (vide tópico 7. Anestesia).

5. CULTURA

Não nos deteremos aqui a fornecer receitas para a realização de culturas axênicas, monoxênicas ou dixênicas, que são necessárias apenas em estudos muito especializados, e que demandam muito tempo e grande quantidade de material e instrumental. Em caso de precisá-lo, o leitor poderá recorrer ao excelente trabalho de Pourriot, 1965, em que encontrará as suficientes indicações.

"A manutenção de Rotíferos durante um período mais extenso em condições alteradas geralmente não apresenta sucesso. Pode-se colocar a amostra em um aquário ou outro recipiente maior, mas a sobrevivência depende da adaptabilidade das espécies às novas condições" (Donner, 1966).

Para fins de observação continuada durante certo espaço de tempo, até 2 meses, muitos Rotíferos, principalmente os Bdelloidea, podem ser mantidos vivos entre lâmina e lamínula, desde que lhes seja oferecido o alimento adequado e que se tomem precauções contra dessecação, guardando-se os preparados em câmara úmida (Donner, 1966).

Os Bdelloidea dos musgos podem ser criados em placas de Petri ou vidros de relógio cobertos, durante semanas ou meses, colocando-se neste o sedimento e a água provenientes da lavagem do material bruto. Nem todas as espécies aparecerão de imediato, algumas só após duas ou três semanas (Pennak, 1953). Donner, 1966 recomenda depositar nas culturas de Rotíferos hirudiniformes pedaços de vidro moído, pois os animais preferem depositar os seus ovos entre pequenos grãos.

Cuidado especial deve ser dispensado à alimentação. "Conforme a espécie, deverá ser oferecido alimento diferente, por exemplo infusórios, euglenas, clorofíceas unicelulares, dinofíceas. Certos Bdelloideos crescem bem em infusões de determinados musgos... Muitos turbilhonadores, aos quais também pertencem os Bdelloidea, podem ser mantidos vivos durante longo tempo com o acréscimo de extrato aquoso ou de água de seu habitat que contenha quantidade suficiente de seu alimento natural (geralmente detrito)" (Donner, 1966). Culturas deste tipo são essenciais para os estudos da bionomia (locomoção, alimentação, construção de abrigos, fenômenos reprodutivos, etc.) de tais espécies.

Também em recipientes maiores, por exemplo cristalizadores, podem ser mantidas temporariamente culturas de Rotíferos, desde que se renove diariamente o terço inferior da água. Pennak, 1953 fornece boas indicações sobre a cultura de Rotíferos em meios preparados no laboratório: "Muitos métodos de cultura de Rotíferos são sugeridos na literatura. Alguns métodos são melhores para certas espécies que outros e se um pesquisador pretende cultivar uma espécie antes não cultivada, deverá experimentar uma variedade de métodos e modificações a fim de conseguir os melhores resultados. Espécies de *Lecane* proliferam em solução de leite maltado 0,1% em água de lagoa, com troca diária da solução. O mesmo gênero foi cultivado em extrato de centeio, pre-

parado moendo-se 20 grãos de centeio em um almofariz e fervendo-se em 100 ml de água por 20 minutos; os Rotíferos deverão ser mantidos em gotas desta solução e mudados diariamente. Extratos de cubos de carne preparados fervendo-se um cubo em 400 ml de água de torneira são bons às vezes. Aveia seca em flocos pode ser usada, fervendo-se 8 a 30 flocos por 3 minutos em 100 ml de água, filtrando e usando-se após 24 horas. *Epiphanes* e certos outros gêneros de lagoas podem ser cultivados em infusões de feno que foram inoculados com um protozoário ou uma alga apropriados. 'Chá de estábulo' é preparado, fervendo-se 800 ml de esterco de cavalo em 1.000 ml de água por uma hora; resfriar, coar, diluir com duas partes de água de chuva fervida, inocular com um organismo alimentar, e envelhecer por uma semana ou dez dias, antes de inocular o Rotífero. Espécies sésseis são extremamente difíceis de serem cultivadas.

A precaução mais importante a ser observada para a cultura de Rotíferos à mudança freqüente da solução de cultura, é evitar uma pronunciada atividade bacteriana".

6. COLORAÇÃO VITAL

A aplicação de corantes vitais em diluições apropriadas (1 : 10.000 a 1 : 100.000 em água destilada; concentrações maiores serão letais) auxilia muito o reconhecimento de órgãos internos. Além do já citado carmin são recomendados na literatura (Donner, 1966, Wulfert, 1969, Koste 1978, Voigt, 1956/57): vermelho neutro (para músculos, glândulas, órgão retrocerebral com eventuais dutos de saída), violeta de cresil real (órgão retrocerebral), azul de cresil brilhante (cérebro), azul de metileno (envoltórios gelatinosos), escarlate R (gorduras), marrom de Bismarck, amarelo de anilina, e alizarina. O Sudan III (traços) em álcool 70% cora gorduras em amarelo alaranjado, diferenciando, nos *Bdelloidea*, as gotículas de material de reserva das pílulas alimentares; acetato de cobre em solução saturada tingem as gotículas de gordura em azul, e após lavagem em água destilada, com acréscimo de ferrocianeto de potássio, em vermelho.

"Cápsulas e envoltórios mucosos podem ser visualizados facilmente com o acréscimo de um pouco de tinta-nanquim" (Donner, 1966). Coloca-se uma gota do corante sobre a lâmina, em contato com o bordo da lamínula; uma tira de papel de filtro colocada junto ao bordo oposto sugará a água, que arrastará o corante, e assim o introduzirá sob a lamínula.

7. ANESTESIA

Para a obtenção de espécimens perfeitamente distendidos, em situação natural, é muitas vezes recomendável anestesiá-los antes da fixação e confecção de preparações permanentes, com os devidos cuidados para se evitar a distorção, contração ou morte em virtude de excesso de narcótico, pois a temperatura e a composição da água podem influenciar o resultado.

Quantidades maiores de animais podem ser anestesiados, expondo-se o vidro de relógio em que se encontram a uma atmosfera de CO₂ (Koste, 1978)

Donner, 1966 indica como anestésicos mais apropriados os seguintes: cloreto de benzamina (solução aquosa 1:100 a 1:1.000), benzamina 2% (eucaina ou betacaina) ou nitrato de estriquina. Koste, 1978 usa ainda o cloreto de cocaína (0,5 a 1%), e Galliford, 1961/62, aplica mentol (cristais), álcool, hidrocloreto de benzamina e formalina muito diluída.

Pennak, 1953 recomenda um método modificado de Myers, 1942, que "deve ser executado sob a lupa binocular. Com uma pipeta fina coloque os Rotíferos em cerca de 2 ml de água em um vidro de relógio côncavo. Se os espécimens provêm de águas ácidas, adicione 3 ou 4 gotas de hipocloreto de neosinefrina 1%; repita em intervalos de 5 minutos, até que todos os Rotíferos estejam deitados no fundo e a ação ciliar cessado... Se os Rotíferos provêm de águas alcalinas, uma solução de hidrocloreto de novocaina ou cocaína 5% em álcool metílico 50% apresenta melhores resultados do que a neosinefrina. Normalmente, porém, estes anestésicos são de difícil obtenção, mesmo para fins cientí-

ficos, e outros substitutivos de obtenção mais fácil deverão ser usados. Cloretona e lactato de benzamina são úteis, e o autor teve considerável êxito com butina 2% e hidrocloreto de hidroxilamina 2%".

Em excursões, os Rotíferos podem ser anestesiados com o acréscimo de algumas gotas da seguinte mistura: 10 cm³ de água + 10 cm³ de álcool etílico + 1 g de cocaína. A aplicação deve ser repetida após 5 ou 10 minutos, evitando-se a agitação da amostra (Voigt, 1956/57). Beuchamp, 1912 usa o álcool metílico, em lugar do etílico.

8. FIXAÇÃO E CONSERVAÇÃO

Em sendo necessária a obtenção de Rotíferos contraídos, como é o caso, muitas vezes, para a determinação de espécies com lórica, colocam-se os animais de preferência diretamente em formalina 10%, sem anestesia prévia. Além de fixar imediatamente os animais, este procedimento causa a contração forte de suas partes moles, expondo a carapaça, e permitindo assim o exame de suas estruturas de valor taxonômico, como espinhos, saliências, rugosidades, etc.

Wulfert, 1969 recomenda como melhor conservante uma solução de formalina 2%, ressaltando contudo a dissolução do pigmento vermelho das manchas oclares. Tais amostras podem ser mantidas por tempo ilimitado em tubos de vidro. A manutenção de Rotíferos em formalina é muito facilitada se a amostra contiver um pouco de glicerina, pois esta evita a formação de aglomerações indesejáveis. A adição de algumas gotas de eosina, que cora os animais, auxilia muito no seu ulterior manuseio e estudo.

No caso de terem sido usadas substâncias narcotizantes, a fixação deve ser imediata por meio de um agente rápido, como o ácido ósmico 1%, ou o fixador de Beauchamp: 1 ml de ácido ósmico 1% + 1 ml de bicromato de potássio 5% + 1 gota de ácido acético (Koste, 1978). Esta última mistura também é muito adequada para fins histológicos. O próprio Beauchamp, 1912 usa apenas o ácido ósmico 1%, ao qual é adicionado ácido cloroplátnico (cloreto platínico) 1% para prevenir a sua redução. "A solução de ácido ósmico permanecerá mais tempo sem deteriorar-se se for... mantida em uma garrafa conta-gotas pintada de preto" (Pennak, 1953). Rotíferos expostos por tempo demasiado a ácido ósmico enegrecerão (Beauchamp, 1912), "mas poderão ser clareados em hidróxido de potássio fraco" (Pennak, 1953).

No já citado método modificado de Myers, Pennak, 1953 recomenda para Rotíferos provenientes de águas ácidas: "Mate e fixe adicionando 3 gotas de ácido ósmico 0,5% ou 1% de uma garrafa conta-gotas e misture rapidamente com a água. Derrame o conteúdo do vidro de relógio em um pequeno frasco, e após 5 minutos decante ou pipete fora a maior parte do fluido, após o que adicione água. Repita a decantação e adição de água de lavagem 3 vezes, em intervalos de 15 minutos".

O mesmo autor, citando Hanley, 1949, expõe que no caso de uma anestesia prévia com hidrocloreto de benzamina, os animais mortos em formalina 10% deverão ser lavados pelo menos 6 vezes em formalina 5% para remover o agente relaxante, que mais tarde poderá cristalizar.

Ótimos resultados foram por mim conseguidos com a seguinte técnica muito simples para obtenção de animais mortos e bem distendidos, não envolvendo qualquer anestesia anterior, e que é recomendada enfaticamente também por Edmondson, 1959 e Pennak, 1953, este último principalmente para as formas iloricadas, como Notommatidae e Bdelloidea, nas quais a anestesia não apresenta sucesso: colocar a amostra com os animais vivos em uma placa de Petri ou vidro de relógio grande, e despejar sobre ela repentinamente igual quantidade de água fervente. Uma boa parte dos Rotíferos estará assim morta em estado de expansão, e a amostra poderá ser fixada e conservada de maneira usual, com formalina ou outro preservante. A mesma técnica também é aplicável às espécies sésseis do perifíton, mesmo quando ainda aderidas ao seu substrato.

Em excursões maiores e mais demoradas, nem sempre é possível transportar-se amostras vivas durante certo tempo, até que se chegue ao laboratório.

Torna-se necessária, então, uma fixação imediata após a coleta com formalina comercial, acrescentando-se esta em tal proporção que a mistura final apresente uma concentração de 10%. Infelizmente perde-se, porém, desta maneira, muito material de estudo contido na amostra.

9. MICROMACERAÇÃO

A determinação taxonômica precisa de muitas espécies de Rotíferos depende de uma cuidadosa análise das peças mastigadoras do mástax. Nem sempre estas peças estão suficientemente visíveis nas preparações comuns, sendo imprescindível, nestes casos, proceder-se a uma micromaceração. Esta consiste em se destruir todas as porções moles do animal, restando apenas as partes duras. A preparação do mástax, embora simples em seu princípio, exige muita prática para chegar-se a resultados satisfatórios.

Como agente macerador, a maioria dos autores recomenda o hipocloreto de sódio; Donner, 1966 usa o de potássio. Koste, 1978 cita "eau de Javelle" e KOH ou NaOH 4%. Voigt, 1956/57 especifica que o hipocloreto de potássio deve ser usado após fixação com ácido ósmico ou formalina; nos outros casos pode ser usado KOH.

Isola-se um espécimen entre lâmina e lamínula e leva-se ao microscópio. Para preparar o mástax, uma gota do solvente é colocada junto à borda da lamínula, e sugada para baixo da mesma, pela técnica do papel de filtro, já descrita para os corantes vitais. Sob o microscópio, verifica-se quando as partes moles estão destruídas e apenas restam as peças duras do mástax, continuando-se então a sucção. O mástax permanecerá fixado entre lâmina e lamínula. Por meio de uma delicada manipulação da lamínula, o mástax pode ser colocado em posição correta. Deve-se proceder a observações em vista superior e lateral, usando-se imersão para uma suficiente diferenciação das complexas estruturas das peças. Evitar o contato do solvente com o óleo de imersão, pois poderá ocorrer saponificação.

Para isolar as diversas peças do mástax, a quantidade de água sob a lamínula deve ser mínima. A movimentação cuidadosa da lamínula provocará a separação das peças, os manúbrios e os uncós apresentando-se então em vista lateral. Wulfert, 1969 atenta para o perigo do uso de solventes muito concentrados, que chegam a destruir partes mais moles do próprio mástax, mas que são importantes para o correto reconhecimento de sua estrutura. Segundo Voigt, 1956/57, o acréscimo de ácido acético diluído ou de tiosulfato de sódio interrompe a micromaceração.

Myers, 1937 descreve uma técnica de maceração em lâminas escavadas, na qual a concavidade contendo uma gota do solvente com o espécimen é coberta com lamínula quadrada, de tal forma que o animal se localiza no ângulo entre a concavidade da lâmina e a lamínula, eventualmente auxiliado com movimentação desta última.

Selando-se a lamínula com vaselina, após secagem total dos bordos, a preparação pode ser guardada durante alguns meses.

10. PREPARAÇÕES PERMANENTES

Para fins de documentação torna-se necessária a confecção de lâminas permanentes, havendo diversos métodos descritos na literatura.

Os meios de inclusão mais apropriados para Rotíferos são a glicerina e a gelatina glicerinada de Kaiser. Em ambos os casos, os animais não podem ser incluídos diretamente; devem antes ser embebidos gradualmente em glicerina, quando da retirada do conservante aquoso; caso contrário, não retêm a sua turgidez e forma natural. Assim, colocam-se os espécimens inicialmente em um vidro de relógio com abundante glicerina 5%, podendo ser acrescentadas algumas gotas de um corante muito diluído que não empalideça (como o carmin, a fucsina, o marrom de Bismarck, por exemplo). Deixar o vidro de relógio abrigado da poeira em tal situação que a água possa evaporar aos poucos, aumentando gradualmente a concentração da glicerina. Isto pode ser feito sob uma campânula de vidro, ao lado de algum desidratante (como a sílica-gel), ou

em uma estufa a 35°C. Este processo demora até uma semana, apresentando porém a vantagem de permear os animais lentamente com glicerina, e diafanizá-los parcialmente. Pode ocorrer que, apesar de todas as precauções tomadas, espécimens iloricados apresentam certo grau de colapso: rugosidade e dobras na pele são vistas como consequência de uma infiltração incompleta da glicerina. Nestes casos, Myers, 1956 adiciona glicerina 50% e igual quantidade de dioxana; deixa evaporar a água e a dioxana, procedendo então à inclusão, ou, se necessário, repetindo a última operação.

Os animais não podem ser retirados da glicerina com uma pipeta, pois normalmente ficam aderidos à superfície interna da mesma. A técnica a ser empregada é a seguinte: sob a lupa binocular, introduzir a ponta de uma agulha (um alfinete entomológico, por exemplo) ou uma cerda de pincel mais rígida, afixada a uma haste, sob o animal, e empurrá-lo cuidadosamente até a superfície; em seguida, levantar bruscamente a agulha. Via de regra, o espécimen encontra-se na pequena gota pendente da ponta da agulha; se não, repetir a operação. Esta gotícula é agora levada ao centro de uma lâmina onde, para facilitar a transferência do animal, já tenha sido colocada previamente uma mínima quantidade de glicerina pura.

Para a montagem de lâminas permanentes em glicerina fluida, Pennak, 1953 recomenda o seguinte método: "Três ou quatro pedaços de 'passe-partout' ou papel gomado são fixados simetricamente em uma lâmina e espaçados em cerca de 10 ou 12 mm, a fim de agirem como suportes para a lamínula, e assim evitarem o esmagamento do espécimen. O Rotífero é então colocado em uma gota de glicerina no centro da lâmina e no meio dos suportes. Em seguida, a lamínula é aproximada cuidadosamente, e um pincel com murrayita tocado no bordo da lamínula; a capilaridade fará a murrayita penetrar entre lâmina e lamínula, circundar a gotícula de glicerina, e preencher completamente o espaço capilar. Tais preparados deverão secar durante algumas horas, e então aplicar alguns anéis de murrayita em intervalos de 24 horas, para maior durabilidade".

A gelatina glicerinada é preparada da seguinte forma: embeber 7 g de gelatina pura durante 2 horas em 42 cm³ de água destilada, acrescentar 50 g de glicerina e 0,5 g de fenol, aquecer em banho-maria durante 10 a 15 minutos sob movimentação constante, e filtrar ainda quente através de algodão de vidro umedecido; deixar esfriar (Romeis, 1948). A gelatina glicerinada é armazenada da melhor maneira em diversos pequenos frascos de boca larga.

Na inclusão em gelatina glicerinada pode-se proceder de duas maneiras: por meio de uma espátula, colocar uma pequena porção da mesma no centro de uma lâmina, que deve ser aquecida cuidadosamente sobre uma lamparina a álcool para fundir o meio de inclusão (evitar fervura!), ou então aquecer a gelatina glicerinada previamente em banho-maria e colocar então uma gota na lâmina. O espécimen a ser incluído é transferido da glicerina, pela técnica já descrita, rapidamente orientado sob a lupa com uma agulha fina (antes do enrijecimento da gelatina), e em seguida coberto com lamínula, eventualmente provida de pezinhos de plastilina ou cera nos seus bordos. A selagem pode ser feita com caedax ou, segundo Koste, 1978, com esmalte para metal, aplicando-se uma pequena gota no bordo da lamínula; por capilaridade o esmalte penetrará até a gelatina, circundando-a, de tal forma que a lâmina permanente assim preparada apresenta uma janela, o que facilita muito o trabalho posterior ao microscópio.

No curso de meus estudos sobre Rotíferos desenvolvi o seguinte método de preparação de lâminas permanentes (Schaden, 1976), que é uma variação de outro utilizado para Nematodos marinhos (fig. 6). Com uma espátula de metal reta, aquecida sobre a chama, uma pequena porção de uma mistura de lanolina com parafina (na proporção 2:1) é retirada de seu recipiente e aplicada sobre uma lâmina, de modo tal a formar duas "costelas" em V aberto. No contato com a lâmina mais fria, a mistura endurece novamente, aderindo à mesma. Em uma pequena gota do meio de inclusão colocada no centro da lâmina, entre as costelas, é depositado o Rotífero, isolado de acordo com a técnica já antes descrita. Coloca-se uma lamínula sobre as costelas e a gota de inclusão (agora já contendo o animal). É essencial para o sucesso da pre-

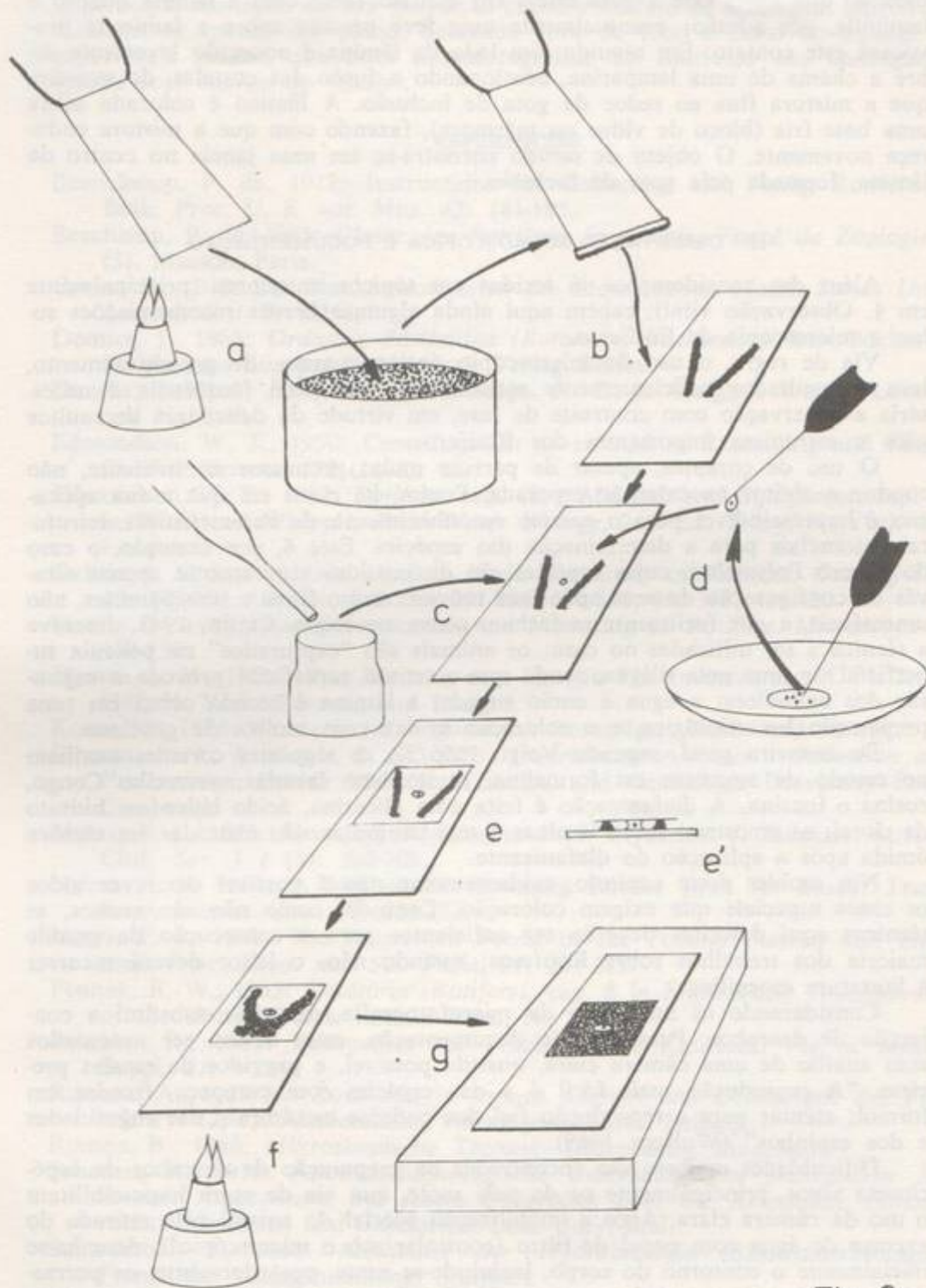


Fig. 6

Fig. 6 — Preparação de lâminas permanentes: a. tomada da mistura de lanolina: parafina (2:1) com espátula aquecida; b. aplicação das "costelas" sobre a lâmina; c. aplicação de uma gotícula de glicerina entre as costelas; d. repicagem do espécimen da glicerina para a lâmina, por meio de uma agulha; e. deposição da lamínula; e'. corte transversal, mostrando a adesão da gota de glicerina, com o espécimen, à lâmina e à lamínula; f. aquecimento brando de um lado da lâmina, com derretimento das costelas; g. deposição da lâmina sobre uma base fria.

paração que nesta fase a gota esteja em contato tanto com a lâmina quanto a lamínula, por adesão; eventualmente uma leve pressão sobre a lamínula provocará este contato. Em seguida, um lado da lâmina é aquecido levemente sobre a chama de uma lamparina, ocasionando a fusão das costelas, de maneira que a mistura flua ao redor da gota de inclusão. A lâmina é colocada sobre uma base fria (bloco de vidro ou mármore), fazendo com que a mistura endureça novamente. O objeto de estudo encontra-se em uma janela no centro da lâmina, formada pela gota de inclusão.

11. OBSERVAÇÃO MICROSCÓPICA E DOCUMENTAÇÃO

Além das considerações já tecidas em tópicos anteriores (principalmente em 4. Observação vital), cabem aqui ainda algumas breves recomendações sobre a microscopia de Rotíferos.

Via de regra, o uso do microscópio óptico comum, de grande aumento, leva a resultados suficientemente satisfatórios, mas com frequência é necessária a observação com contraste de fase, em virtude da delicadeza de muitos gêos e estruturas importantes dos Rotíferos.

O uso de corantes, apesar de parecer muito promissor ao iniciante, não conduz a efeitos na extensão esperada. Porém, há casos em que a sua aplicação é imprescindível para o correto reconhecimento de características estruturais essenciais para a determinação das espécies. Este é, por exemplo, o caso do gênero *Polyarthra*, cujas espécies são distinguidas seguramente apenas através da configuração de seus apêndices móveis, muito finos e transparentes, não umectáveis, e que facilmente se fecham como um leque. Carlin, 1943, descreve a técnica a ser utilizadas no caso: os animais são "capturados" na película superficial de uma gota d'água, sendo que a tensão superficial provoca a expansão dos apêndices; a água é então sugada, a lâmina é secada como em uma preparação bacteriológica, e a coloração se faz com violeta de genciana.

De maneira geral, segundo Voigt, 1956/57, os seguintes corantes auxiliam no estudo de amostras em formalina, muito bem lavadas: vermelho Congo, eosina e fucsina. A diafanização é feita com glicerina, ácido láctico ou hidrato de cloral; as amostras, sobre lâminas e sem lamínulas, são mantidas em câmara úmida após a aplicação do diafanizante.

Nos moldes deste capítulo, evidentemente não é possível descrever todos os casos especiais que exigem coloração. Contudo, como não são muitos, as técnicas aqui descritas deverão ser suficientes para a consecução da grande maioria dos trabalhos sobre Rotíferos; quando não, o leitor deverá recorrer à literatura específica.

Considerando as limitações da microfotografia, esta não substitui a confecção de desenhos. Para fins de documentação, estes devem ser executados com auxílio de uma câmara clara, quando possível, e providos de escalas precisas. "A reprodução mais fácil é a das espécies com carapaça, fixadas em formol; atentar para a reprodução fiel dos padrões esculturais, das rugosidades e dos espinhos" (Wulfert, 1969).

Dificuldades maiores são encontradas na preparação de desenhos de espécimens vivos, principalmente os de pele mole, que via de regra impossibilitam o uso da câmara clara. Após a imobilização parcial do animal pela retirada do excesso de água com papel de filtro (controlar sob o microscópio!), desenha-se inicialmente o contorno do corpo, incluindo-se neste, posteriormente, os pormenores (coroa, pé com dedos, antenas, órgãos internos, etc.), tomando-se muito cuidado em se ater fielmente às proporções (por exemplo tamanho das pílulas estomacais, densidade das rugosidades, espessura dos órgãos e estruturas, etc.). "De nenhuma maneira os desenhos poderão ser estilizados ou exagerados" (Donner, 1966). Também nestes casos não deve faltar uma escala.

As necessárias mensurações, realizadas de preferência através de uma ocular micrométrica, devem ser feitas em animais de posição perfeitamente plana. Devem abranger o comprimento total do animal, a sua maior largura, as dimensões das diversas partes, etc.

Como bem adverte Koste, 1978, a microfotografia tem aplicação apenas restrita no estudo dos Rotíferos, apesar de ter certo valor como documento.

A principal limitação em sua utilização consiste no fato de a imagem reproduzir nitidamente apenas um plano, deixando fora de foco o resto do animal. A experiência mostra que boas microfotografias de Rotíferos são conseguidas apenas com auxílio de "flash".

REFERÊNCIAS

- Beauchamp, P. de, 1912: Instructions for Collecting and Fixing Rotifers in Bulk. *Proc. U. S. nat. Mus.* 42: 181-185.
- Beauchamp, P. de, 1965: *Classe des Rotifères*, in Grasse, *Traité de Zoologie* 4 (3). Masson, Paris.
- Carlin, B., 1943: Die Planktonrotatorien des Motalaström. *Medd. Lunds Univ. Limnol. Inst.* 5: 1-256.
- Donner, J., 1965: *Ordnung Bdelloidea (Rotatoria, Bdelloidea)*. Best.-Bücher z. Bodenfauna Europas 6. Akademie Verlag, Berlin.
- Donner, J., 1966: *Rotifers* (trad. e adapt. H. G. S. Wright). Warne, London and N. York.
- Edmondson, W. T., 1950: Centrifugation as an Aid in Examining and Fixing Rotifers. *Science* 112 (2898): 49.
- Edmondson, W. T., 1959: *Rotifera*, cap. 18, e *Methods and Equipment*, cap. 46 in Ward and Whipple, *Fresh-Water Biology*, 2nd Ed. Wiley, N. York and London.
- Galliford, A. L., 1961/62: How to Begin the Study of Rotifers. *Country-Side* 19: 150-156, 188-194, 246-250, 291-294, 334-339, 382-388, 424-430.
- Hanley, J., 1949: The Narcotization and Mounting of Rotifera. *Microscope* 7: 154-159.
- Hyman, L. H., 1951: *Class Rotifera*, cap. 13, 4 in *The Invertebrates* 3. McGraw-Hill, N. York, Toronto and London.
- Koste, W., 1978: *Rotatoria (Monogononta)*. Bornträger, Berlin und Stuttgart.
- Lincoln, R. J., & Sheals, J. G., 1979: *Invertebrate Animals - Collection and Preservation*. British Museum, London, and Cambridge University Press, Cambridge.
- Myers, F. J., 1936: Mounting Rotifers in Pure Glycerine. *J. Quekett microsc. Club. Ser. 3* 1 (5): 200-208.
- Myers, F. J., 1937: A Method of Mounting Rotifer Jaws for Study. *Trans. amer. microsc. Soc.* 56: 256-257.
- Myers, F. J., 1942: The Rotatorian Fauna of the Pocono Plateau and Environs. *Proc. Acad. nat. Sci. Phila.* 94: 251-285.
- Pennak, R. W., 1953: *Rotatoria (Rotifers)*, cap. 8 in *Fresh-Water Invertebrates of the United States*. Ronald Press, N. York.
- Pourriot, R., 1965: Recherches sur l'écologie des Rotifères. *Vie et Milieu, Suppl.* 21: 1-224.
- Remane, A., 1929/33: *Rotatoria*, in Bronns *Klassen und Ordnungen des Tierreichs* 4 (2, 1). Akademische Verlagsgesellschaft, Leipzig.
- Romeis, B., 1948: *Mikroskopische Technik*. Oldenbourg, München.
- Schaden, R., 1976: *Faunistisch-ökologische Untersuchungen planktischer Rädertiere Amazoniens, mit einem Ueberblick über die Kenntnisse südamerikanischer Arten und Unterarten*. Diss. Univ. Kiel.
- Schwoerbel, J., 1966: *Methoden der Hydrobiologie (Süßwasserbiologie)*. Franck'she Verlagshandlung, Stuttgart.
- Streble, J., & Krauter, D., 1973: *Das Leben im Wassertropfen*. Franck'she Verlagshandlung, Stuttgart.
- Voigt, M., 1956/57: *Rotatoria (Die Rädertiere Mitteleuropas)*, 2 vols. Bornträger, Berlin.
- Wulfert, K., 1969: *Die Rädertiere (Rotatoria)*. Die Neue Brehm-Bücherei 416. Ziemsen, Wittenberg und Lutherstadt.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOLOGIA

MANUAL DE TÉCNICAS PARA A PREPARAÇÃO DE COLEÇÕES ZOOLOGICAS

LISTA DE FASCÍCULOS

- | | |
|---|--|
| 1. Generalidades | 22. Pantopoda |
| 2. Esponjas marinhas* | 23. Arachnida (Scorpionida, Solifugae,
Pseudoscorpiones, Ricinulei,
Opiliones, Palpigradi, Uropygi,
Amblypygi, Araneae) |
| 3. Esponjas de água doce* | 24. Acari |
| 4. Cnidaria | 25. Crustacea |
| 5. Ctenophora | 26. Myriapoda (Chilopoda, Symphyla,
Pauropoda, Diplopoda) |
| 6. Gnathostomulida | 27. Insetos imaturos* |
| 7. Plathelminthes (Turbellaria)* | 28. Insetos |
| 8. Platemintos (Temnocefálicos,
Trematódeos, Cestóides, Cesto-
dários) e Acantocéfalos* | 29. Mollusca |
| 9. Nemertinea (Rhynchocoela) | 30. Sipuncula |
| 10. Rotifera* | 31. Phoronida |
| 11. Gastrotricha* | 32. Brachiopoda |
| 12. Cephalorhyncha (Priapulida,
Nematomorpha e Kinorhyncha) | 33. Chaetognatha |
| 13. Nematoda | 34. Echinodermata |
| 14. Entoprocta e Ectoprocta
(Bryozoa) | 35. Hemichordata, Urochordata e
Cephalochordata |
| 15. Annelida (Polychaeta) | 36. Peixes |
| 16. Annelida (Oligochaeta) | 37. Anfíbios |
| 17. Annelida (Hirudinea) | 38. Répteis* |
| 18. Tardigrada | 39. Aves |
| 19. Echiura | 40. Mamíferos |
| 20. Onychophora | |
| 21. Pentastomida (Linguatulida) | |

* Já publicados.