



MANUAL DE TÉCNICAS PARA A PREPARAÇÃO DE COLEÇÕES ZOOLOGICAS

11. GASTROTRICHA

LILIANA FORNERIS

SÃO PAULO

1985

11. GASTROTRICHA

LILIANA FORNERIS

INTRODUÇÃO

Gastrotricha é um filo com representantes microscópicos raramente excedendo 1 mm, encontrados em ambiente aquático. À primeira vista podem ser confundidos com representantes de Turbellaria e Gnathostomulida, mas são reconhecidos, mesmo em pequeno aumento, por sua morfologia e movimento.

As dificuldades do estudo dos Gastrotricha são devidas à existência de muitas descrições específicas incompletas ou incorretas.

Os gastrótricos de águas doces eutróficas são bem conhecidos; é fragmentário ou nulo o conhecimento dos representantes do filo em outros ambientes límnicos. Gastrótricos marinhos têm sido intensamente estudados em vários centros nos últimos anos, mas o conhecimento está longe de ser satisfatório.

O filo ainda não foi estudado intensivamente no Brasil. Daday (1905: 76, 77) descreveu sucintamente duas espécies: *Chaetonotus pusillus* e *Chaetonotus dubius*, encontradas em áreas inundadas pelo rio Paraguai em Corumbá, Mato Grosso.

As razões da insuficiência de informações sobre gastrótricos brasileiros são, em parte, devidas ao fato de que seu estudo exige instrumental óptico de qualidade e, em parte, porque a maioria das espécies tem pequeno número de indivíduos. Pode-se acrescentar que a obtenção e manipulação dos animais depende muito do acaso; a análise das amostras coletadas pode levar longo tempo, com resultados imprevistos; a maioria das espécies deve ser observada com objetiva de imersão, ocasionando perdas que prejudicam muitas vezes trabalho de longa duração. A identificação é difícil também, em muitos casos, pela falta de preparações documentais. Por isso, aqueles que desejam dedicar-se ao estudo dos gastrótricos devem, além de boa dose de paciência e meticulosidade, estar emocionalmente preparados para superar a decepção proporcionada pela alta porcentagem de tempo improficuo.

HISTÓRICO

Já no século 18 conhecia-se o fato de os Gastrotricha — especialmente de água doce — possuírem indivíduos pertencentes aos menores metazoários conhecidos. A primeira espécie de água doce foi descoberta em 1718 por Joblot e a primeira espécie marinha foi descrita em 1853 por Schultze, que a considerou como gastrótrico aberrante. Ehrenberg (1830) separou os gastrótricos de água doce, os únicos então conhecidos, dos Rotatoria, dando ao grupo o nome de Ichthydina, enquanto Dujardin, na mesma época, considerou-os como Infusoria.

O interesse pelos gastrótricos alternou-se entre estudos de espécies de água doce (início do século) e de formas marinhas (a partir de 1930).

Foi Metchnikoff que, em 1865, definiu e caracterizou os Gastrotricha no sentido que têm ainda em grande parte atualmente, em oposição a Rotatoria, qualificados como Cephalotricha. A anatomia, entretanto, só começou a ser conhecida com a monografia de Zelinka, publicada em 1889. Importantes trabalhos do século XIX, tanto de anatomia, como de conhecimento de formas,

permitiram manter a posição sistemática de Gastrotricha ao lado e não dentro de Rotatoria. A partir da década de 20, graças aos trabalhos de Remane, o estudo da morfologia e anatomia tomou grande impulso, que se estende até nossos dias. Nos anos setenta, com emprego de microscopia eletrônica, muitos aspectos da morfologia foram corrigidos e o desenvolvimento de espécies marinhas foi estudado. Porém, devido às dificuldades de seu encontro e estudo, desconhecem-se completamente os gastrótricos de muitos ambientes em diferentes regiões da terra.

POSIÇÃO SISTEMÁTICA

Os Gastrotricha têm posição sistemática controvertida, em parte devido ao pequeno número de estudos aprofundados dos sistemas de órgãos e à insuficiência de estudos sobre o desenvolvimento.

Muitas questões anatômicas têm sido insolúveis pelo fato de os conhecimentos terem se limitado quase que exclusivamente à descrição de formas.

Os Gastrotricha têm sido considerados como Filo independente (Rieger & Rieger, 1977) ou como Classe do Filo Aschelminthes ou Nematelminthes *sensu lato*, que inclui grupos bem diferentes como Rotifera, Nematoda, Kinorhyncha e Priapulida (Hyman, 1951).

Relações naturais entre Gastrotricha e Nematelminthes e sua filogenia são ainda obscuras (Beklemishev, 1958; Remane, 1958, 1963; Steinboeck, 1958). Este último autor, partidário da primitividade dos Acoela, insistiu sobre os caracteres de Turbellaria dos gastrótricos, referindo que seus ancestrais deveriam ser similares a *Platodes*. Algumas espécies de gastrótricos só diferem de turbelários pela presença de ânus, pela ciliação, e pelo parênquima reduzido. Gastrotricha foi também comparado com Archiannelida. Remane (*op. cit.*) considerou as similaridades entre Gastrotricha e Turbellaria, bem como aquelas com Annelida, como convergência, e derivou o filo de celomados primitivos.

Os Gastrotricha, outrora considerados aparentados com Rotatoria, são separados destes na base da cutícula, estrutura fina do mástax e embriologia.

Gastrotricha e Nematoda, e provavelmente Tardigrada, apresentam características simpliomórficas: construção da faringe, plexo nervoso faríngeo, sistema nervoso central e periférico e órgãos sensoriais (Remane, 1936; Teuchert, 1977a).

Os Gastrotricha têm um sistema nervoso ortogonal, o que demonstra uma posição intermediária entre Nematelminthes e Plathelminthes.

A estrutura fina das células epiteliais de alguns gastrótricos, que se revelaram monociliadas, mostra similaridade única com os Gnathostomulida (Rieger, 1976). Entretanto, as diferenças entre os dois grupos são muito pronunciadas para sugerir um ancestral comum.

Os gastrótricos são considerados como dotados de uma blastocela (Hyman, 1951) de condições acelomadas (Rieger *et al.*, 1974). Entretanto, estudos de Teuchert (1977b), com reconstrução estrutural do corpo da espécie *Turbanella cornuta* Remane, mostraram a presença de duas cavidades revestidas por células mesodérmicas; portanto, com características de cavidades celomáticas. Não há porém homologia com celoma verdadeiro, devido à ausência de celomóporos, nefrídios e metamerização.

Por suas características primitivas, o "Filo" Gastrotricha tem sido colocado, ao lado de Gnathostomulida, na base dos Protostomia.

DEFINIÇÃO

Metazoários "pseudocelomados", microscópicos ou sub-microscópicos (0,06 a 1,50 mm, raramente 2-4 mm), bilaterais, aquáticos, de vida livre, com corpo de forma variável, tendo superfície dorsal convexa e ventral plana. Frequentemente, há uma seção cefálica, ligada a um tronco por uma porção estreitada (pescoço). A porção cefálica é arredondada anteriormente e lobulada. Extremidade caudal arredondada ou bilobada.

Corpo revestido por uma epiderme muito fina, de estrutura variável conforme as regiões. A epiderme é descrita nas formas de água doce como sincicial, com poucos núcleos, quando situada na superfície dorsal do corpo, e com muitos núcleos quando situada nas superfícies ventral e lateral. É coberta por uma cutícula finíssima, que pode formar escamas, pêlos ou espinhos. Em espécies marinhas, a epiderme é descrita como constituída de células mono- ou multiciliadas, coberta por uma cutícula multiestratificada, que também forma espinhos, escamas e pêlos. A epiderme contém numerosas glândulas isoladas ou que desembocam em prolongamentos da parede do corpo — os chamados túbulos adesivos, pois essas glândulas secretam substâncias adesivas.

Músculos circulares englobam os músculos longitudinais, que têm posição dorsal, lateral e ventral. Musculatura circular e longitudinal estriada transversal e obliquamente.

Sistema nervoso de tipo ortogonal: consiste de cérebro, formado por 2-3 gânglios bilobados — um dorsal, oposto à parte anterior do tubo digestivo e 1-2 ventro-laterais, ligados por uma comissura. Dois pares de nervos cefálicos longitudinais em posição lateral e ventro-lateral e dois nervos longitudinais laterais sub-epidérmicos, ligados por comissuras circulares. Órgão Y de ambos os lados do trato digestivo. Um par de órgãos sensoriais laterais na extremidade anterior do corpo, numerosos pêlos sensoriais e manchas oculares simples, pigmentadas ou incolores.

Tubo digestivo reto com boca terminal ou sub-terminal ventral e ânus ventral ou dorsal, próximo da extremidade posterior. Consiste de faringe muscular, esôfago curto ou rudimentar e estômago-intestino.

Cavidade do corpo par, pouco desenvolvida, com revestimento de células mesodérmicas (apenas evidenciadas em uma espécie). Sistema circulatório ausente. Protonefrídios. Hermafroditas ou apenas fêmeas partenogênicas. Gônadas pares ou ímpares, em posição dorsal, ventral ou lateral. Abertura feminina próxima ou afastada do ânus. Um ou dois vasos deferentes. Abertura masculina ímpar, em posição variável, na face ventral. Desenvolvimento direto. Segmentação total.

CLASSIFICAÇÃO

O filo *Gastrotricha* tem, até o presente, cerca de 500 formas mencionadas na literatura. Consta de uma única Classe, dividida em duas Ordens: *Macrodasyida* e *Chaetonotida*.

A Ordem *Macrodasyida* contém 6 famílias e é exclusivamente marinha ou de água salobra. Compreende 29 gêneros e cerca de 157 espécies e 22 formas descritas, mais 67 espécies apenas mencionadas e não determinadas nem descritas. As espécies desta ordem não apresentam um padrão único de forma de corpo.

Diagnose: Marinhos, psamobiontes, com túbulos adesivos, faringe em λ (Y invertido), dotada de poros abrindo para o exterior, anel muscular circular ao redor do tubo digestivo. Hermafroditas: gônadas pares polarizadas, gametas produzidos simultaneamente; transferência indireta de esperma. Fertilização interna.

A Ordem *Chaetonotida* compreende 7 famílias; duas contêm apenas representantes marinhos e 4 apenas representantes na água doce. Uma espécie ocorre tanto na água doce como no mar e uma espécie tem hábito semi-terrestre. Conhecem-se desta ordem 285 espécies e 13 formas, além de 46 espécies não descritas, distribuídas por 25 gêneros. As espécies desta ordem têm um padrão uniforme de forma de corpo.

Diagnose: Preferencialmente de água doce, mas também marinhos, salobros e semi-terrestres. Sem túbulos adesivos, além da furca posterior diferenciada, que pode estar ausente. Sem poros na faringe, cuja luz é em Y (Y direito). Redução das musculaturas circular e longitudinal da parede do corpo e da musculatura circular ao redor do intestino. Apenas fêmeas partenogênicas.

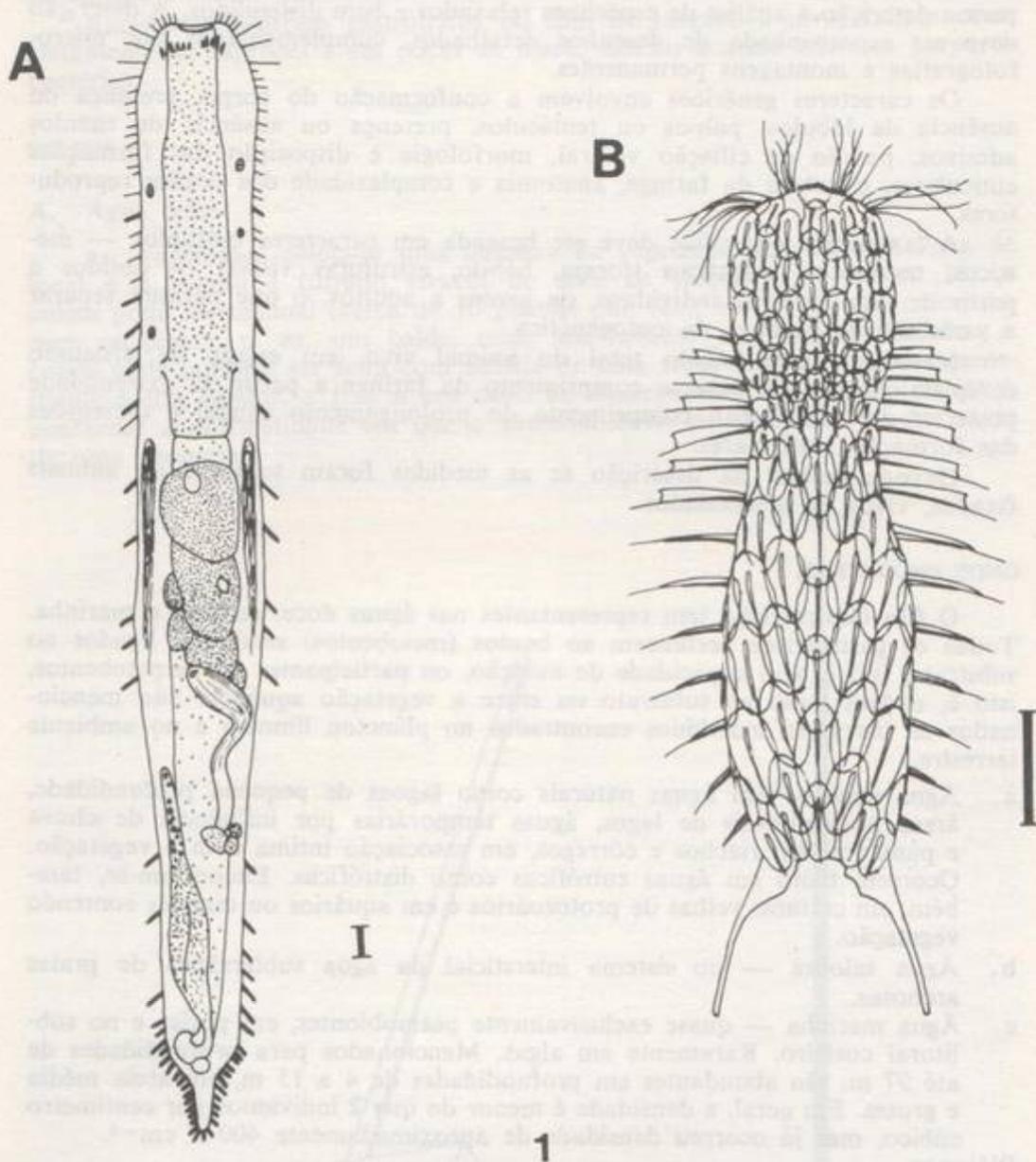


Fig. 1 — A. Macrodasyida: *Macrodasys* sp. (Ilha Porchat, Santos), hábito, vista ventral (original). B. Chaetonotida: *Chaetonotus aculifer* Gerlach, hábito, vista dorsal (seg. Schrom, 1966). (Linha = 20 micra).

IDENTIFICAÇÃO

A identificação de gastrótricos é em muitos casos difícil. Muitas descrições fornecem poucas informações, esquecendo de mencionar caracteres importantes. Há necessidade de reescrever e documentar mais completamente muitas descrições genéricas e específicas. A norma tem sido descrever e determinar com base apenas em material preservado, o que é falho. Além disso, a observação com objetiva de imersão é essencial para a identificação.

Sabe-se muito pouco sobre a variabilidade inter-específica, o que leva a dificuldades no enquadramento de novas formas. Uma revisão de muitos gêne-

ros, como p. ex. *Macrodasys*, é urgente. Por isso, a descrição de espécies deve ser bastante detalhada para possibilitar comparações futuras. Deve-se utilizar para a descrição a análise de espécimes relaxados e bem distendidos. A descrição deve ser acompanhada de desenhos detalhados, complementados por microfotografias e montagens permanentes.

Os caracteres genéricos envolvem a conformação do corpo, presença ou ausência de lóbulos, palpos ou tentáculos, presença ou ausência de túbulos adesivos, padrão de ciliação ventral, morfologia e disposição das formações cuticulares, estrutura da faringe, anatomia e complexidade dos órgãos reprodutores.

A taxonomia específica deve ser baseada em caracteres múltiplos — métricos, merísticos, eidóticos (forma, hábito, estruturas vistas) — obtidos a partir de uma série de indivíduos, de jovens a adultos, o que permite separar a variabilidade genética da ontogenética.

Medidas: Comprimento total do animal vivo, em estado de distensão completa; largura da cabeça; comprimento da faringe a partir da extremidade posterior do tubo bucal; comprimento do prolongamento caudal e dimensões das formações cuticulares.

Deve-se indicar na descrição se as medidas foram tomadas de animais fixados, vivos ou anestesiados.

ONDE ENCONTRAR

O filo *Gastrotricha* tem representantes nas águas doce, salobra e marinha. Todos os gastrótricos pertencem ao bentos (meiobentos) sendo ou ligados ao substrato, isto é, sem capacidade de natação, ou participantes do herpetobentos, isto é, nadam junto ao substrato ou entre a vegetação aquática. São mencionados na literatura indivíduos encontrados no plâncton límnico e no ambiente terrestre.

- a. Água doce — em águas naturais como lagoas de pequena profundidade, áreas psamolitorais de lagos, águas temporárias por influência de chuva e pântanos; em riachos e córregos, em associação íntima com a vegetação. Ocorrem tanto em águas eutróficas como distróficas. Encontram-se, também, em culturas velhas de protozoários e em aquários ou tanques contendo vegetação.
- b. Água salobra — no sistema intersticial da água subterrânea de praias arenosas.
- c. Água marinha — quase exclusivamente psamobiontes, em praias e no sublitoral costeiro. Raramente em algas. Mencionados para profundidades de até 97 m, são abundantes em profundidades de 4 a 15 m, em areia média e grossa. Em geral, a densidade é menor do que 2 indivíduos por centímetro cúbico, mas já ocorreu densidade de aproximadamente $400 \times \text{cm}^{-3}$.

Biótopos

Em água doce, os gastrótricos ocorrem nos seguintes biótopos:

1. sapropel — próximos à superfície de lodo rico em celulose ou na camada de folhas em decomposição do fundo. A densidade é máxima onde ocorrem intensos processos de decomposição, onde há déficit de oxigênio e riqueza de H_2S , CH_4 e ácidos graxos.
2. vegetação — principalmente junto a raízes de plantas flutuantes e na base de folhas de ninfeas; nos espaços pseudo-plantônicos, entre plantas submersas.
3. Em musgos úmidos, na margem de lagoas (a areia marginal é biótopo sem significado).
4. filme de água ao redor de partículas de solo, em florestas.

Em ambientes marinhos e de água salobra estão ligados ao bentos; o biótopo principal é o substrato arenoso, especialmente o sistema intersticial. Há uma relação entre a granulometria do sedimento e as espécies presentes. Areias grossas, p. ex. cascalho consistindo de fragmentos de conchas de moluscos e areia de anfioxo, apresentam povoamento mais rico. Areia fina de granulação uniforme contém, em geral, poucas espécies.

No interessante biótopo da água subterrâneo, que se estende sob a praia, e onde encontramos uma graduação das condições de água marinha para água quase doce, encontram-se várias espécies.

Raramente ocorrem gastrótricos no fital de sargaço e ulva; faltam completamente no sapropel e em poças de maré, mesmo quando ocorrem purpurobactérias.

COLETA

A. Água doce

a. Vegetação: coleta-se uma amostra da vegetação, lava-se com água do local e o lavado é filtrado através de seda de plâncton n.º 15 ou 18. A coleta pode ser manual (cerca de 10 plantas por vez); as plantas são colocadas num recipiente, p. ex. um balde, onde são lavadas e o líquido filtrado. A coleta pode também ser feita com auxílio de uma rede, feita de algodão, semelhante a um coador, e fixa a um cabo de madeira de comprimento variável, conforme a profundidade em que o material deve ser coletado, ou por meio de uma ancoreta.

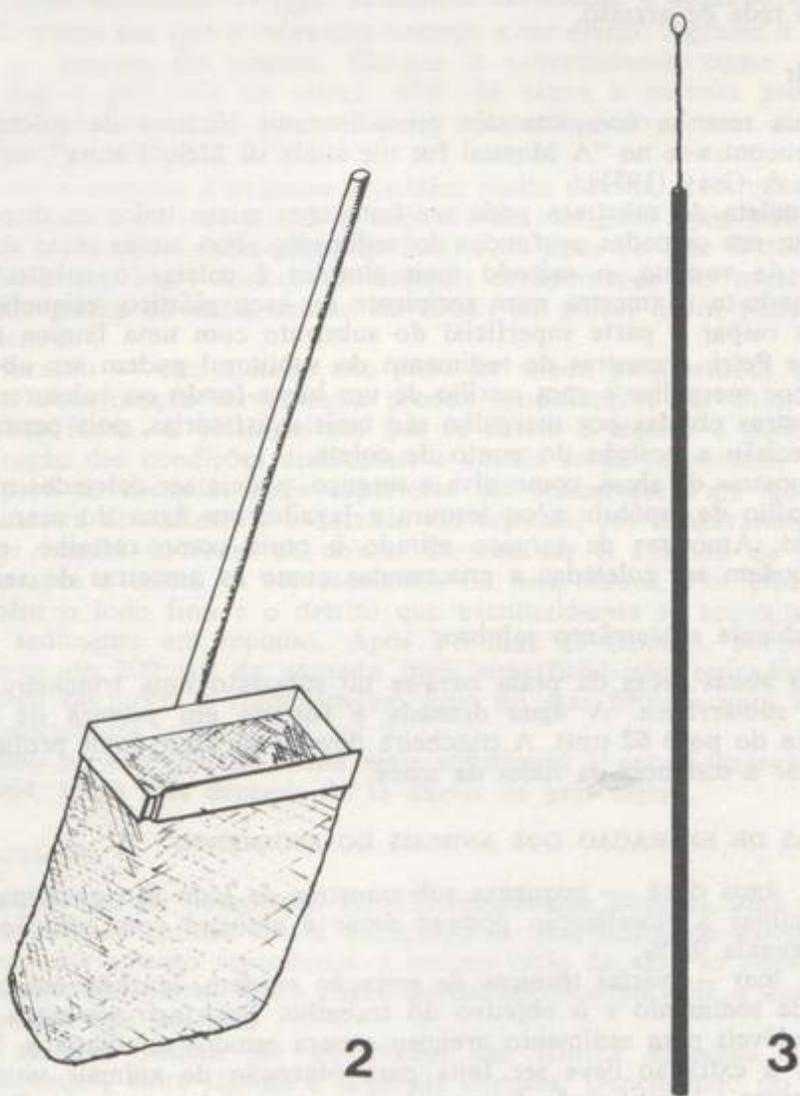


Fig. 2 — Modelo de rede para coleta de vegetação de água doce.

Fig. 3 — Argola de Irwin.

Puxar uma rede de plâncton convencional entre as plantas, filtrando a água, pode proporcionar a coleta de exemplares. Impede-se a entrada das plantas na rede adaptando-se em sua boca uma peneira de malha grossa.

A obtenção de gastrótricos de objetos submersos, como folhas de nenúfar, pode ser feita com auxílio de um sifão.

b. Lodo: a superfície do lodo é sifonada ou cavada e colocada num recipiente com água do local. Pode-se entrar n'água, nas margens de um corpo d'água lântica, munido de um tubo de vidro, plástico ou metal, com 10 cm de diâmetro. Esse tubo é pressionado verticalmente no sedimento até a profundidade de 25-30 cm. Arrolha-se a extremidade superior do tubo e pode-se então retirá-lo do sedimento. A amostra pode ser colocada em frasco "banho-maria" (8 cm de diâmetro x 16 cm de altura) ou cristalizador, deixando-se em repouso por várias horas.

Amostras de regiões mais profundas de corpos de água podem ser obtidas com pequeno busca-fundo, p. ex. tipo Ekman ou amostradores de testemunhos geológicos (sondas) com 50 cm de comprimento e 5 cm de diâmetro, dotados de lastro adequado às várias profundidades que se deseje amostrar. Em profundidades menores de 4 m o amostrador geológico pode ser operado sem adição de pesos e adaptado à extremidade de uma vara de madeira.

c. Folhas em decomposição, depositadas no fundo: coletam-se com auxílio de uma rede de arrasto.

B. Mar

Uma resenha completa dos procedimentos técnicos de coleta nesse ambiente encontra-se no "A Manual for the study of Meio Fauna", compilado por Hulings & Gray (1971).

A coleta do substrato pode ser feita com quase todos os dispositivos que penetram nas camadas profundas do sedimento. Nas zonas secas da praia, por ocasião da vasante, o método mais simples é coletar o substrato com pá, depositando-se a amostra num recipiente ou saco plástico, etiquetado. Pode-se também raspar a parte superficial do substrato com uma lâmina de vidro ou placa de Petri. Amostras de sedimento do sublitoral podem ser obtidas diretamente por mergulho e com auxílio de um busca-fundo ou coletores geológicos. As amostras obtidas por mergulho são mais satisfatórias, pois permitem anotar com precisão a posição do ponto de coleta.

Amostras de algas, como ulva e sargaço, podem ser coletadas manualmente com auxílio de espátula e/ou tesoura e lavadas em água do mar, filtrando-se o lavado. Amostras de sargaço atirado à praia como restolho, na linha do deixa, podem ser coletadas e processadas como as amostras de sedimento.

C. Ambiente subterrâneo salobro.

Nas zonas secas da praia cava-se no substrato uma trincheira até atingir a água subterrânea. A água drenada é filtrada em peneira de malha fina (diâmetro do poro 62 μ m). A trincheira deverá ser tanto mais profunda quanto maior for a distância da linha da maré.

TÉCNICAS DE EXTRAÇÃO DOS ANIMAIS DO SEDIMENTO

A. água doce — pequenas sub-amostras de lodo são examinadas à lupa. Para facilitar a visualização pode-se corar a amostra com solução aquosa de Rosa Bengala 0,1%.

B. mar — várias técnicas de extração existem, levando em consideração o tipo de sedimento e o objetivo do trabalho. Restringir-nos-emos às técnicas recomendáveis para sedimento arenoso e para estudos qualitativos. Sempre que possível, a extração deve ser feita para obtenção de animais vivos, pois em muitos casos a identificação é impossível em material preservado. Para extração de animais vivos de amostras com pequeno volume de sedimento e ricamente povoadas, deixa-se primeiramente a amostra em repouso em água do mar filtrada e a intervalos de tempo analisam-se sob lupa sub-amostras da camada superior.

Por ocasião de expedições ou quando o número de amostras é grande e não há tempo para um processamento individual completo, cada amostra de sedimento é anestesiada, p. ex. com solução isotônica de $MgCl_2 \times 6H_2O$ a 7,5% e, durante o processo de anestesia, formol puro tamponado é gotejado lentamente, até que a concentração final seja de pelo menos 5%. Deixa-se fixar por 24 horas.

Quando o volume de sedimento é grande ou quando se dispõe de curto tempo, pode-se utilizar os seguintes procedimentos para concentrar a fauna:

a. filtração — a amostra do sedimento é colocada num balde. Acrescenta-se água do mar filtrada. Agita-se vigorosamente. Deixa-se assentar o sedimento e decanta-se através de coador feito de seda com poros de 62 μm (pode-se usar dois coadores ou peneiras superpostas, com poros variando de 30-40 μm e 50-62 μm , respectivamente). O filtrado que contém os animais e o detrito orgânico mais leve é lavado para o fundo do coador, repetindo-se a operação por duas vezes. O coador é evertido num recipiente apropriado, p. ex. placa de Petri, contendo água do mar filtrada.

b. anestesia e filtração — acrescenta-se à amostra de sedimento em água do mar filtrada, colocada num recipiente (p. ex. balde), igual volume de solução isotônica de cloreto de magnésio a 6-7% (73,2 g de $MgCl_2 \times 6H_2O \times l^{-1}$, para água do mar com salinidade 34⁰/₀₀). Mistura-se levemente e deixa-se em repouso por 10', tempo em que o relaxante começa a ter efeito. Agita-se a seguir o sedimento e, quando ele assenta, filtra-se o sobrenadante, como em a. Esta técnica tem a eficiência de extrair 95% da fauna e permite processar facilmente amostras de até 10 litros. Como relaxante pode-se usar também solução de $MgSO_4 \times 7 H_2O$ a 20%.

Nota — Quando a amostra é pequena e contém muito detrito, a filtração pode ser feita numa peneira de seda montada num aro de plexiglas. Após a filtração esse dispositivo é colocado numa placa de Petri com água do mar filtrada e o conjunto deixado em lugar fresco. Os animais recuperam-se da anestesia e atravessam pela malha da seda, caindo no fundo da placa; assim podem ser isolados do detrito.

c. deterioração — este método não pode ser usado para estudos quantitativos, pois a deterioração da amostra produz modificações na composição específica de sua fauna. O princípio em que se baseia a técnica é aquele em que a deterioração das condições ambientais e anóxia força os animais vágéis a migrarem para as camadas mais superiores do sedimento. Para que isso aconteça, a amostra de sedimento é deixada em repouso, em temperatura levemente superior àquela do local de coleta. Deve-se ter o cuidado de retirar imediatamente após a coleta os representantes da macrofauna. Por pipetagem retira-se também o lodo fino e o detrito que eventualmente se acumulam na superfície do sedimento em repouso. Após 2-3 dias de repouso, porções de sedimento (cerca de 200 cc) da camada mais superficial são retirados com auxílio de colher ou pipeta e colocados em água do mar filtrada num Becker de 500 cc e processados como em a. ou b.

Um método de extração da fauna mais sofisticado é aquele desenvolvido por Uhlig (1964, 1968) mas depende de se dispor de gelo salino.

EXAME DOS ANIMAIS

Os animais devem ser observados vivos e, sempre que possível, logo depois da coleta. O exame do animal vivo é indispensável, pois dados de locomoção, alimentação, comportamento reprodutivo e mesmo ciclo de vida só podem ser obtidos por observação direta. Esses dados devem ser incorporados à descrição sistemática, sempre que possível.

Espécies maiores podem ser observadas em lâmina escavada ou em preparação "elevada", entre lâmina e lamínula comuns. Dependendo do tamanho do animal, coloca-se numa lâmina um pouco de água filtrada do local de coleta. A seguir, deposita-se o espécime e fazem-se as observações preliminares quanto ao hábito, movimento e estruturas externas. Se possível, tomam-se algumas medidas. Coloca-se então a lamínula. Para animais moles e delicados (p. ex. muitos Macrodsyida), a lamínula deve estar sustentada (preparação

"elevada"), para prevenir que o animal seja amassado pelo peso dela e por pressão capilar. Aos quatro cantos da lamínula faz-se aderir, por raspagem, fragmentos de cera de abelha ou plastilina, que darão a necessária sustentação e elevação.

A imobilização do espécime pode ser obtida adicionando-se uma gota de solução de agar a 1,5% ao líquido contendo o gastrótrico ou por leve compressão da lamínula. A imobilização de gastrótricos marinhos também pode ser obtida deixando-se a lâmina com o exemplar em câmara úmida, por algumas horas no escuro. Isso evita o emprego da anestesia.

A observação de formas muito pequenas pode ser feita em gota pendente sob a superfície de uma lamínula colocada numa armação de metal ou papelão. Esse tipo de montagem, além de permitir utilizar objetiva de imersão, facilita o livre acesso de oxigênio ao espécime.

Para poder observar o espécime em diferentes ângulos, pode-se movimentar levemente a lamínula, fazendo com que o espécime gire ao redor de seu eixo longitudinal ou conseguir esse movimento por meio de um fio de cabelo introduzido entre a lâmina e a lamínula.

Pressionando levemente a lamínula ou obtendo essa pressão pela retirada de uma pequena quantidade de líquido da preparação, o espécime se achata, tornando-se transparente e permitindo análise detalhada da organização interna. Se o animal deve ser posteriormente utilizado para histologia, a compressão deve ser mínima.

Para observação com imersão a óleo, a preparação deve conter pequena quantidade de líquido sob a lamínula e aconselha-se usar pequena quantidade de óleo de imersão. Caso contrário, o espécime se deslocará durante a focalização.

Todas as observações devem ser feitas ao microscópio óptico com ocular 15X e preferencialmente em contraste de fase e luz transmitida. Observações ao microscópio eletrônico de dispersão (SEM) não são obrigatórias para a taxonomia.

ANESTESIA

Embora haja dificuldade de obtenção de animais relaxados, a anestesia pode ser utilizada tanto para formas marinhas como para aquelas de água doce ou salobra. Como os resultados não são uniformes e não podem ser padronizados é aconselhável uma observação contínua do animal, durante o processo de anestesia.

As formas de água doce são facilmente anestesiadas com cocaína. Coloca-se o animal numa gota de água do local de coleta sobre uma lâmina e, com o auxílio de uma agulha, deposita-se uma pequena porção de cocaína em pó (ou solução de cocaína a 1%) e aguarda-se que o animal cesse de se locomover; a anestesia ocorre lentamente. Dispondo-se de vários indivíduos, a anestesia pode ser feita em placa de Petri pequena.

Para formas marinhas a anestesia não dá resultados comparáveis. Ao se imobilizarem, muitos animais se contraem. Entretanto, a anestesia indicada é aquela efetuada em solução isotônica de cloreto de magnésio em água do mar (veja item B.a. de Técnicas de extração dos animais do sedimento), que deixa os mecanismos ciliares funcionando normalmente e simplifica a observação. O procedimento deve ser acompanhado, especialmente naqueles animais com cutícula delicada, sem formações cuticulares. Por isso, bons resultados são conseguidos, às vezes, combinando anestesia e fixação. Ao recipiente contendo o animal em processo de anestesia vai-se adicionando lentamente gotas de formol a 10%. Os animais morrem gradualmente e permanecem, via de regra, bem esticados.

FIXAÇÃO

Nenhum dos métodos de fixação usados é suficientemente bom para manter todas as características diagnósticas num único indivíduo. A adição do fixador tem como efeito a contração rápida e geralmente intensa do gastrótrico,

alterando, às vezes, até a morfologia do animal. A fixação em estado distendido depende muito do acaso.

A fixação dos gastrótricos de água doce deve ser feita logo que os animais anestesiados se imobilizam. Gastrótricos marinhos se imobilizam, na maioria dos casos, em perfeito relaxamento, depois da evaporação parcial da gota de água do mar que os contém, à medida que aumenta progressivamente o teor de cloreto de sódio.

Formol neutro a 10% ou álcool 70%, ambos feitos com água do mar, são recomendáveis para os gastrótricos marinhos; formol a 5% *, para os de água doce. O fixador é adicionado lentamente, gota a gota. No final do processo, decanta-se o líquido e substitui-se-o por outro.

Ácido ósmico a 1% em água destilada é também utilizado. A fixação, nesse caso, pode ser facilitada com o seguinte procedimento: coloca-se o espécime vivo numa gota de água sobre uma lâmina que é invertida sobre a boca de um frasco contendo a solução de ácido ósmico, deixando-se pelo tempo de 5-10 segundos. O escurecimento do espécime resultante da fixação do ácido ósmico pode ser tratado cuidadosamente com água oxigenada a 3%.

Fixação a quente (50°C) é aconselhada para espécimes destinados a cortes histológicos, pois esse método evita contração. Aquece-se o líquido fixador e coloca-se rapidamente sobre o espécime.

Para microscopia eletrônica utiliza-se dupla fixação: fixa-se primeiro em glutaraldeído a 3%, por 2 horas, em temperatura de 4°C; lava-se na solução tampão e faz-se a pós-fixação em tetróxido de ósmio a 2%, também a 4°C. Ambos os fixados são tamponados em fosfato 0,1 M (pH 7,2) com sucrose a 10% e traços de cloreto de cálcio. Cita-se também como tampão solução de cacodilato de sódio 0,2 M (pH 7,4).

PRESERVAÇÃO

A preservação depende do fixador usado, mas em geral indica-se uma mistura de álcool 70% e glicerina, na proporção de 95:5, o que impede a dessecação.

COLORAÇÃO

Vários corantes podem ser usados para corar os espécimes, como por exemplo fucsina, vermelho neutro (1:10.000), bórax carmim, ácido pícrico ou azul de metileno. O corante diluído é acrescentado por conta-gota na margem da lamínula, em preparação entre lâmina e lamínula ou a coloração pode ser feita em lâmina escavada.

O procedimento para utilização do corante bórax-carmim é o seguinte: Acrescenta-se o corante diluído (1%) e deixa-se que penetre (normalmente 10 minutos). Diferencia-se em álcool ácido (4 gotas de ácido clorídrico em 100 cc de álcool 70%), até que o espécime assumo um aspecto transparente e brilhante. Transfere-se então para álcool 90%.

MONTAGEM "IN TOTUM"

A montagem total, quando bem sucedida, auxilia o estudo e permite a conservação do espécime-tipo. Por isso, só é aconselhável para indivíduos bem relaxados. Para espécies dotadas de formações cuticulares, a montagem total não é adequada para fins de sistemática, porque essas estruturas ficam bastante afetadas durante o processo.

A montagem total é feita preferencialmente entre duas lamínulas, com área de 25 mm², o que facilita a observação, sob imersão, das faces dorsal e ventral. Esse tipo de montagem é emoldurada em metal (moldura de alumínio de Cobb) ou papelão.

Quando a montagem é feita entre lâmina e lamínula, pode-se fazer previamente na lâmina uma moldura com esmalte de unha. Essa moldura deve ser

* O formol comercial contém cerca de 40% de aldeído fórmico (metanol) junto com impurezas. Diluindo 8 vezes com água, o formol resultante fica a 5%.

de tamanho tal que permita o assentamento da lamínula. Esse procedimento facilita a aplicação do luto — o próprio esmalte — quando a preparação estiver pronta. Os espécimes podem ser corados durante o processo de montagem total.

a. Montagem em glicerina líquida — O princípio em que se baseia esse tipo de montagem consiste em colocar o espécime lentamente em glicerina pura. Para isso, transfere-se o espécime fixado para uma solução de glicerina a 50% (1 parte de glicerina + 1 parte de formol a 10% ou solução de glicerina a 5% diluída em álcool a 50%). O recipiente, p. ex. uma lâmina, contendo o espécime em uma gota de glicerina a 50% é deixado numa câmara de evaporação, por uma semana ou até que haja apenas um filme cobrindo o espécime. Acrescenta-se então glicerina pura. Cobre-se com lamínula. Luta-se, se for o caso, com esmalte. Isso torna a preparação mais duradoura. Pode-se lutar também com araldite ou luto comum.

Nota: O inconveniente da glicerina é ter índice de refração muito alto para dar uma boa definição da imagem.

b. Montagem em glicerina-gelatina — Coloca-se uma gota de glicerina-gelatina fundida em uma lâmina (ou lamínula). Transfere-se o espécime e, sob lupa, orienta-se na posição desejada. Coloca-se lamínula, limpa-se o excesso de gelatina das margens e luta-se.

c. Montagem permanente em bálsamo do Canadá — Os espécimes são desidratados e diafanizados antes da montagem. O procedimento é o seguinte: Animais fixados são lavados em álcool 70% por 10 minutos; álcool 95% (3 mudas) por 15 minutos; álcool absoluto (3 mudas) por 45 minutos; xilol, 3 lavagens subseqüentes de 5 minutos cada. Montagem.

d. Montagem em epon-araldite — Este tipo de montagem, quando feito em moldes planos laminares, é adequado para observação em microscopia óptica com contraste de fase e tem a vantagem de permitir reconstruções tridimensionais acuradas. É o tipo ideal de montagem, também, para a conservação de espécime-tipo em coleções de Museus de Zoologia. Após a fixação (ver item fixação) e desidratação, transfere-se o espécime para a resina não polimerizada em molde laminar. Após a infiltração completa do espécime, polimeriza-se a resina por aquecimento (para detalhes do processo ver item seguinte).

INCLUSÃO PARA CORTES

a. Em parafina para cortes histológicos — Exceto para formas muito pequenas, o tratamento após a fixação não traz dificuldades. A desidratação deve ser lenta: álcool 50%, 70%, 90%, 96%; deixar no máximo meia hora em cada porcentagem de álcool. Deve-se evitar o álcool absoluto, que tem ação endurecedora. Do álcool 96% transfere-se o espécime para óleo de cravo e a seguir para uma mistura de celoidina com óleo de cravo na proporção 1:1, com o seguinte procedimento: Coloca-se uma pequena gota dessa mistura numa lamínula ou lâmina escavada e deposita-se aí o espécime, que é orientado na posição desejada sob lupa. Goteja-se, então, clorofórmio, cuidadosamente, sobre a preparação, até que ela endureça. Após 1-2 horas pode-se iniciar a inclusão do disco obtido, contendo o espécime, em parafina. Aconselha-se 3 banhos de parafina, de 30 minutos cada, antes da inclusão propriamente dita. Para facilitar a visualização, o espécime pode ser corado antes da desidratação.

Mistura óleo de cravo-celoidina — Dissolve-se celoidina em volume de álcool e éter em quantidades iguais. Adiciona-se volume igual de óleo de cravo. Mistura-se bem. Espera-se até que o odor de éter desapareça. Dilui-se com óleo de cravo até a mistura tornar-se mais ou menos fluida.

b. Em epon-araldite para microscopia eletrônica — Após fixação apropriada, desidrata-se em série crescente de álcoois (50 a 100%), a duração de cada troca sendo 5 minutos, em temperatura ambiente. Inclui-se na resina (epon-araldite), depois de passar pelo óxido de propileno. Essa substância vai permitir a infiltração da resina. Depois de suficientemente bem infiltrado deixa-se secar o bloco em estufa a 60°C por 4 dias.

Cortes histológicos — Aconselha-se fixação em Bouin a quente (60°C), inclusão em celoidina-parafina e cortes de 5-6 μ m. As seções são coradas com hematoxilina-eosina.

Separação das formações cuticulares

a. Formas de água doce — À preparação contendo o espécime acrescenta-se ácido acético diluído. Movimenta-se delicadamente a lamínula, procurando acompanhar sob lupa ou microscópio a separação das escamas e espinhos. Estes podem ser pipetados, colocados em água destilada e corados com fucsina.

b. Formas marinhas (Thaumastodermatidae, Chaetonotidae, Lepidodasyidae). Pode-se separar e corar as formações cuticulares com mistura de orceína acética (50 cc de solução saturada de orceína em álcool 95% acidificada com 2 cc de ácido clorídrico).

CULTIVO

O cultivo foi tentado apenas para espécies de água doce.

a. Meio de cultura: sustagem 0,1 g
água filtrada do local de coleta .. 100 cc

Ferve-se a água por 5 minutos e acrescenta-se a sustagem fervendo por 1 minuto. Inocula-se quando a solução estiver fria.

b. Inocula-se culturas velhas de protozoários.

c. Coloca-se plantas aquáticas num aquário e analisa-se após uma semana.

MANIPULAÇÃO DOS ESPÉCIMES

A transferência dos indivíduos durante as várias etapas do estudo pode ser feita com pipeta Pasteur de ponta fina ou grossa, de acordo com o tamanho dos espinhos cuticulares, com uma argola de Irwin ou com estilete.

Os indivíduos de muitas espécies, principalmente marinhos, são dotados de grande poder de adesão. Por isso, é aconselhável que a pipeta Pasteur utilizada para a transferência de espécimes vivos seja revestida internamente com silicone.

Indivíduos em glicerina não devem ser pipetados, porque aderem frequentemente à superfície interna do vidro e são facilmente perdidos. Podem ser pescados da glicerina com a argola de Irwin ou com uma cerda de escova de dentes fixa à ponta de um palito de fósforo. A argola ou a cerda são simplesmente deslizadas sob o indivíduo e elevadas rapidamente. Frequentemente, o indivíduo adere ao dispositivo numa gotícula de glicerina.

A argola de Irwin consiste de uma micro-argola que fica na extremidade de um arame de aço fino, quando dobrado e enrolado. Esse arame é montado num suporte de madeira. A argola é achatada e tem inclinação de 30°. Tem vantagem sobre a pipeta e cerda pois raramente o indivíduo fica aderido. O diâmetro interno da argola pode variar de 0,3 a 0,8 mm.

Para colocar o animal na posição desejada em preparações totais permanentes ou semi-permanentes pode-se utilizar um estilete.

SEQUÊNCIA NO PROCEDIMENTO DA OBSERVAÇÃO E TOMADA DE MEDIDAS EM MATERIAL VIVO

1. Obtenção de animais pelo exame de amostra: sob lupa binocular.
2. Separação de um espécime por meio de pipeta capilar e colocação numa pequena gota numa lâmina comum ou na depressão de uma lâmina escavada.
3. Observação ao microscópio com ocular 10X e objetiva 16 mm (10X); hábito, movimento, algumas características evidentes.
4. Medidas: comprimento do corpo e da faringe, largura da cabeça, pescoço e corpo feitas com objetiva 4 mm (44X).
5. Fotografar, se possível. Desenhar.
6. Anestésiar adicionando o anestésico.
7. Tomar medidas novamente e completar o desenho com observação da posição dos órgãos internos.
8. Fixar.
9. Montar "in toto", ou incluir para cortes histológicos ou microscopia eletrônica.

Como a fixação raramente mantém todas as características diagnósticas num único indivíduo, desenhos, fotografias e medidas são documentos indispensáveis para acompanhar o espécime-tipo, quando existir. A má qualidade de muitas fotografias publicadas torna muitas vezes insatisfatória essa forma de documentação. Assim, desenhos feitos a partir de animal vivo são o complemento documental imprescindível. De outro lado, um desenho é preparado mais ou menos subjetivamente, de acordo com a experiência individual do observador e/ou a resolução real do microscópio usado. Assim, apenas as medidas tomadas com precisão constituem um objetivo elementar de documentação. Das características mensuráveis dentro do grupo há 20 métricas, 5 numeráveis e 21 relações.

Da maioria das espécies falta o espécime-tipo e, em muitos casos, mesmo esse está inadequadamente preservado.

Formação de coleções — indivíduos montados "in toto" ou amostras de sedimento podem constituir coleções. As preparações totais, quando montadas em glicerina ou bálsamo, devem ser guardadas em posição horizontal. Deve ser tentada a conservação de espécime-tipo em preparações totais montadas em epon-araldite. Tais preparações, de duração indefinida, parecem sobrepujar qualquer problema curatorial associado com preservação de material. Amostras de sedimento, conservadas antes da triagem e identificação devem ser guardadas em recipientes adequados, no líquido fixador, dotadas de etiquetas duráveis, trazendo os dados da coleta, dados ecológicos e demais informações. Preparações totais efetuadas a partir de animais observados vivos devem trazer etiquetas e no livro de assentamento correspondente devem constar as observações, medidas, desenhos e fotografias.

A rotulação completa deve anotar: localização precisa do habitat, data de coleta, nome do coletor, anotações especiais sobre as condições ambientais e organismos associados.

BIBLIOGRAFIA

- Beauchamp, P. de, 1965. Classes des Gastrotriches. In: Grassé, P.-P., ed. *Traité de Zoologie*. Paris, Masson. v. 3, fasc. 3, p. 1381-400.
- Beklemishev, W. N., 1958. *Grundlagen der vergleichenden Anatomie der Wirbellosen*. Berlin, VEB Deutscher Verlag der Wissenschaften. v. 1.
- Beklemishev, W. N., 1969. *Principles of comparative anatomy of invertebrates*. Edinburgh, Oliver & Boyd. v. 1.
- Brunson, R. B., 1918. Gastrotricha. In: Edmonson, W. T., ed. *Fresh-water biology*. N. Y., John Wiley & Sons, Inc. p. 406-19.
- D'Hondt, J.-L., 1967. Effects de quelques anesthésiques sur les Gastrotriches. *Experientia, Basel* 23: 1025-6.
- D'Hondt, J.-L., 1971. Gastrotricha. *Ann. Rev. Oceanogr. Mar. Biol., Aberdeen* 9: 141-92.
- Daday, E., 1905. Untersuchungen ueber die Suesswasser — Mikrofauna Paraguays. IV. Nematorhyncha. *Zoologica, Stuttgart*, 18(44): 72-86.
- Grimstone, A. W., 1980. *O microscópio eletrônico em biologia*. São Paulo, EDUSP, EPU. 70 p. (Temas de biologia II).
- Hulings, N. C. & Gray, J. S., 1971. A manual for the study of meiofauna. *Smithson. Contrib. Zool.*, Washington, 78: 1-83.
- Hummon, W. D., 1971. The marine and brackish-water Gastrotricha in perspective. In: Hulings, N. C., ed. *International Conference on Meiofauna*, 1. Proceedings. *Smithson. Contrib. Zool.*, Washington, 76: 21-3.
- Hyman, H. L., 1951. *The Invertebrates: Acanthocephala, Aschelminthes and Entoprocta — the pseudocoelomate Bilateria*. N. Y., McGraw-Hill, v. 3.
- McIntyre, A. D., 1971. Meiofauna and microfauna sampling. In: Holme, N. A. & McIntyre, A. D., eds. *Methods for the study of marine benthos*. Oxford, Blackwell Sci. Publs. p. 131-39 (IBP Handbook, 16).
- Pantin, C. F. A., 1959. *Notes on microscopical technique for zoologists*. Cambridge, Cambridge University Press, 77 p.

- Pennak, R. W., 1953. *Fresh-water invertebrates of the United States*. Gastrotricha. N. Y., Ronald Press. 769 p. (148-58).
- Remane, A., 1958. Zur Verwandtschaft und Ableitung der niederen Metazoen. *Zool. Anz.*, Leipzig, suppl. 21: 179-96.
- Remane, A., 1963. The systematic position and phylogeny of the Pseudocoelomates. In: Dougherty, E. C., ed. *The lower Metazoa*. Berkeley, University of California Press. p. 247-55.
- Rieger, R. M., 1976. Monociliated epidermal cells in Gastrotricha: significance for concepts of early metazoon evolution. *Z. Zool. Syst. Evolut.-forsch.*, Frankfurt, 14: 198-226.
- Rieger, G. E. & Rieger, R. M., 1977. Comparative fine structure study of the gastrotrich cuticule and aspects of cuticule evolution within the Aschelminthes. *Z. Zool. Syst. Evolut.-forsch.*, Frankfurt, 15: 81-124.
- Rieger, R. M.; Ruppert, E.; Rieger, E. G. & Schoepfer-Sterrer, C., 1974. On the fine structure of gastrotrichs with description of *Chordodasys antennatus* sp. n. *Zool. Scripta*, Stockholm, 3: 219-37.
- Ruppert, E. E., 1982. Comparative ultrastructure of the gastrotrich pharynx and the evolution of myoepithelial foreguts in Aschelminthes. *Zoomorphology*, Berlin, 99: 181-220.
- Steinboeck, O. Zur Phylogenie der Gastrotrichen. *Zool. Anz.*, Leipzig, suppl. 21: 128-69.
- Teuchert, G., 1977a. The ultrastructure of the marine gastrotrich *Turbanella cornuta* Remane (Macrodasyoidea) and its functional and phylogenetical importance. *Zoomorphologie*, Berlin, 88: 189-246.
- Teuchert, G., 1977b. Leibeshoehleverhaeltnisse von dem marinen Gastrotrich *Turbanella cornuta* Remane (Ordnung Macrodasyoidea) und eine phylogenetische Bewertung. *Zool. Jb. Anat. Ont.*, Jena, 97: 586-96.
- Uhlig, G., 1964. Eine einfache Methode zur Extraktion der vagilen mesopsammalen Mikrofauna. *Helgolaender wiss. Meeresunters.*, Kiel, 11: 178-85.
- Uhlig, G. 1968. Quantitative methods in the study of interstitial fauna. *Trans. Am. microsc. Soc.*, Lancaster, 87: 226-32.

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,
Paupoda, Diplopoda) |
| 6. Gnathostomulida | 27. Insetos imaturos* |
| 7. Plathelminthes (Turbellaria)* | 28. Insetos |
| 8. Platelmintos (Temnocefálidos,
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.