

Comunicações do Museu de Ciências da PUCRS



ISSN 0100-4573

MÉTODOS BÁSICOS E NOVOS PARA O CULTIVO DE PROTISTAS LIVRES. Diethardt Horst Armin Jebram	3
TÉCNICAS DE PREPARAÇÃO DE RÉPTEIS E MAMÍFEROS FÓSSEIS. Cristina T. G. Gresele, Maria Vitória Y. Müller, Valdor Ochagavía da Costa	21
ESTRUTURA POPULACIONAL E FECUNDIDADE DE <i>PACHYGRAPSUS GRACILIS</i> (SAUSSURE, 1858) NO MOLHE DO RIO TRAMANDAÍ, RIO GRANDE DO SUL, BRASIL (CRUSTACEA, DECAPODA, GRAPSIDAE). Getúlio Dornelles Souza, Nelson Ferreira Fontoura	29
REALOCAÇÃO GENÉRICA DE <i>XENODON WERNERI</i> EISELT, 1963 (SERPENTES: COLUBRIDAE). Vanda Lúcia Ferreira Yuki	39
CONTRIBUIÇÃO AO CONHECIMENTO DA PISCICULTURA DO PEIXE-REI <i>ODONTHESTES BONARIENSIS</i> (VALENCIENNES, 1835) — NOVAS INFORMAÇÕES E EXPERIMENTOS LABORATORIAIS. Jeter Jorge Bertoletti, Rose Maria Borges Fortes Widholzer, Isabel Cristina Junqueira, Valkíria Montardo Munçone	49



COMUNICAÇÕES DO MUSEU DE CIÊNCIAS DA PUCRS

Chanceler

Dom Altamiro Rossato

Reitor

Professor Irmão Norberto Francisco Rauch

Vice-Reitor

Professor Irmão Avelino Madalozzo

Pró-Reitor de Administração

Professor Antonio Mario Pascual Bianchi

Pró-Reitor de Graduação

Professor Francisco Alfredo Garcia Jardim

Pró-Reitor de Pesquisa e Pós-Graduação

Professor Monsenhor Urbano Zilles

Pró-Reitor de Extensão Universitária

Professor Irmão Elvo Clemente

Pró-Reitor de Assuntos Comunitários

Professor João Carlos Gasparin

Diretor do Museu de Ciências da PUCRS

Professor Dr. Jeter J. Bertoletti

Pedidos de assinaturas devem ser
encaminhados para EDIPUCRS

Assinatura anual:

Brasil 3,20 URV

Exterior 20US\$

Número atraso 1,60 URV

Formas de pagamento:

Cheque ou vale postal em nome da

Revista para EDIPUCRS

Av. Ipiranga, 6681 - Prédio 33

Caixa Postal 1429

90619-900 Porto Alegre RS

Os artigos para publicação devem ser
encaminhados para:

Museu de Ciências da PUCRS

Conselho Editorial

Av. Ipiranga, 6681 / Caixa Postal 1429

90619-900 Porto Alegre RS

FAX (051) 339-1564

A Revista aceita trocas

We ask for exchange

Conselho Editorial:

Ana Clair R. Bertoletti

Jeter J. Bertoletti (Diretor)

Marcos Di Bernardo

Carlos Alberto S. de Lucena

Composição:

GRAFLINE

Impressão:

EPECÊ

C741c Comunicações do Museu de Ciências
da PUCRS. - N.1 (1971) -
Porto Alegre: PUCRS, 1971.
v.
Irregular.
ISSN 0100-4573
1. Ciências - Periódicos. I. PUCRS.

C.D.D. 505

Comunicações do Museu de Ciências da PUCRS

ISSN 0100-4573

MÉTODOS BÁSICOS E NOVOS PARA O CULTIVO DE PROTISTAS LIVRES. Diethardt Horst Armin Jebram	3
TÉCNICAS DE PREPARAÇÃO DE RÉPTEIS E MAMÍFEROS FÓSSEIS. Cristina T. G. Gresele, Maria Vitória Y. Müller, Valdor Ochagavía da Costa	21
ESTRUTURA POPULACIONAL E FECUNDIDADE DE PACHYGRAPSUS GRACILIS (SAUSSURE, 1858) NO MOLHE DO RIO TRAMANDAÍ, RIO GRANDE DO SUL, BRASIL (CRUSTACEA, DECAPODA, GRAPSIDAE). Getúlio Dornelles Souza, Nelson Ferreira Fontoura	29
REALOCAÇÃO GENÉRICA DE XENODON WERNERI EISELT, 1963 (SERPENTES: COLUBRIDAE). Vanda Lúcia Ferreira Yuki	39
CONTRIBUIÇÃO AO CONHECIMENTO DA PISCICULTURA DO PEIXE-REI ODONTHESTES BONARIENSIS (VALENCIENNES, 1835) — NOVAS INFORMAÇÕES E EXPERIMENTOS LABORATORIAIS. Jeter Jorge Bertoletti, Rose Maria Borges Fortes Widholzer, Isabel Cristina Junqueira, Valkíria Montardo Munçone	49

Comunicações do Museu de Ciências da FUCRS

1952 (1951-52)

1	1952 (1951-52)
2	1953 (1952-53)
3	1954 (1953-54)
4	1955 (1954-55)
5	1956 (1955-56)
6	1957 (1956-57)
7	1958 (1957-58)
8	1959 (1958-59)
9	1960 (1959-60)
10	1961 (1960-61)
11	1962 (1961-62)
12	1963 (1962-63)
13	1964 (1963-64)
14	1965 (1964-65)
15	1966 (1965-66)
16	1967 (1966-67)
17	1968 (1967-68)
18	1969 (1968-69)
19	1970 (1969-70)
20	1971 (1970-71)
21	1972 (1971-72)
22	1973 (1972-73)
23	1974 (1973-74)
24	1975 (1974-75)
25	1976 (1975-76)
26	1977 (1976-77)
27	1978 (1977-78)
28	1979 (1978-79)
29	1980 (1979-80)
30	1981 (1980-81)
31	1982 (1981-82)
32	1983 (1982-83)
33	1984 (1983-84)
34	1985 (1984-85)
35	1986 (1985-86)
36	1987 (1986-87)
37	1988 (1987-88)
38	1989 (1988-89)
39	1990 (1989-90)
40	1991 (1990-91)
41	1992 (1991-92)
42	1993 (1992-93)
43	1994 (1993-94)
44	1995 (1994-95)
45	1996 (1995-96)
46	1997 (1996-97)
47	1998 (1997-98)
48	1999 (1998-99)
49	2000 (1999-00)
50	2001 (2000-01)
51	2002 (2001-02)
52	2003 (2002-03)
53	2004 (2003-04)
54	2005 (2004-05)
55	2006 (2005-06)
56	2007 (2006-07)
57	2008 (2007-08)
58	2009 (2008-09)
59	2010 (2009-10)
60	2011 (2010-11)
61	2012 (2011-12)
62	2013 (2012-13)
63	2014 (2013-14)
64	2015 (2014-15)
65	2016 (2015-16)
66	2017 (2016-17)
67	2018 (2017-18)
68	2019 (2018-19)
69	2020 (2019-20)
70	2021 (2020-21)
71	2022 (2021-22)
72	2023 (2022-23)
73	2024 (2023-24)
74	2025 (2024-25)
75	2026 (2025-26)
76	2027 (2026-27)
77	2028 (2027-28)
78	2029 (2028-29)
79	2030 (2029-30)
80	2031 (2030-31)
81	2032 (2031-32)
82	2033 (2032-33)
83	2034 (2033-34)
84	2035 (2034-35)
85	2036 (2035-36)
86	2037 (2036-37)
87	2038 (2037-38)
88	2039 (2038-39)
89	2040 (2039-40)
90	2041 (2040-41)
91	2042 (2041-42)
92	2043 (2042-43)
93	2044 (2043-44)
94	2045 (2044-45)
95	2046 (2045-46)
96	2047 (2046-47)
97	2048 (2047-48)
98	2049 (2048-49)
99	2050 (2049-50)
100	2051 (2050-51)

MÉTODOS BÁSICOS E NOVOS PARA O CULTIVO DE PROTISTAS LIVRES

Diethardt Horst Armin Jebram¹

ABSTRACT

Free Aliving protozoa/protistans are only very slightly investigated in Brazil. To iniciate studies about these ecologically important organisms, new and easily aplicable methods have been developed on the base of certain traditional ones. As well have been presented reasons not to use certain other traditional methods. Have been presented: reasons to study living protistans and not only preserved probes, a method for "isolation of protistans by capillary pipettes along series of drops", basic and new cultivation media for freshwater protistans, basic and partially new types of alimentation for many species of protozoans, and a mode to set up slides to study living protistans in the microscope.

INTRODUÇÃO

Pesquisas sobre protozoários parasíticos apresentam uma boa tradição no Brasil, enquanto os protistas de vida livre são pouco investigados.

Porém, os protistas livres têm muita importância nos ecossistemas, especialmente nas águas e no solo. Protistas fotossintéticos põem em disposição uma grande parte da produção primária necessitada para sustentar cadeias alimentares. Protistas fagotróficos, como consumidores primários e secundários, transmitem a energia armazenada pelos produtores aos consumidores maiores. Vários protistas livres, além de

1. Laboratório de Protistologia. Instituto de Biociências – PUCRS. Av. Ipiranga, 6681 – Prédio 12, BR-90619-900 Porto Alegre-RS – Brasil.

bactérias e fungos, têm importância na remineralização de substâncias orgânicas e na reciclagem de elementos, portanto, para a fertilidade do solo e da água. Com esses processos eles também decompõem uma grande parte de substâncias venenosas e, assim, têm um papel importante na desintoxicação do meio ambiente. Além disso, nos países mais desenvolvidos, protistas são usados como objetos modelos em pesquisas sobre as ultraestruturas de seres vivos, sobre a citologia, fisiologia, bioquímica, biofísica, genética e a evolução, mas também no ensino, nas disciplinas biológicas. Tudo isso mostra a importância dos protistas, o que exige pesquisas sobre eles.

Para certos tipos de investigações, especialmente para levantamentos populacionais e estatísticos de uma fauna qualitativamente já conhecida, pode-se usar amostras fixadas. Porém, na bibliografia antiga encontram-se muitas descrições erradas ou insuficientes e sinônimos errados, porque aquelas pesquisas foram realizadas a base de amostras preservadas. Então, para começar a conhecer a fauna de protistas de uma nova área e identificar as espécies corretamente, investigações à base de organismos vivos são indispensáveis. Em seguida será demonstrado, como pode-se iniciar estudos sobre protistas livres e vivos — especialmente de água doce.

PROCURA E COLETA DE AMOSTRAS

Protistas vivem em quase todas as águas naturais, seja num arroio, rio, lago, no mar ou numa pequena água parada, que ficou depois de uma chuva forte por alguns dias, mas também no solo terrestre, na superfície de rochas ou da casca de árvores. Protistas encontram-se também nas águas em baldes ou vasos, que ficaram expostos à circulação livre do ar, nas "fitotelmas" entre as bases das folhas de bromeliáceas ou na água presa entre as folhas de musgos, para dar somente alguns exemplos.

Para iniciar o trabalho com protistas existe um método tradicional através de uma cultura não limpa ("cultura crua") de protozoários por meio de "infusões": Em recipientes com água coloca-se certos materiais orgânicos como "fertilizantes", como feno, folhas de alface ou partes de casca de banana. Aqui no Brasil, a água corrente, que sai da torneira, normalmente contém muito cloro para combater bactérias. Então, tem que ferver essa água para que libere o cloro, que inibe também a propagação dos protozoários. Depois de resfriada, a água pode ser usada para a infusão. Nesta aparecem, numa certa seqüência e além de bactérias, fungos e algas microscópicas, vários protozoários, como pequenos flagelados heterotróficos e vários ciliados, e finalmente algumas amebas. Eles desenvolvem-se a partir de estágios encistados, que estavam presos nas superfícies dos materiais vegetais de inóculo ou entraram transportados pelo ar. As espécies encontradas nessas infusões e a seqüência de aparência das espécies depende parcialmente do tipo e da quantidade do material usado na infusão e do lugar da sua realização (por exemplo, na Europa ou na América do Sul, ou numa cidade grande ou numa vila no campo). Em geral vale que não deve-se

colocar muito material orgânico na infusão para evitar que se desenvolvam excessivamente muitas bactérias nela e consomem o oxigênio e, por isso, protozoários comuns, que são aeróbicos, não conseguem sobreviver nela. E muito melhor, por pouco material orgânico na infusão e, talvez, inocular nela também uma certa porção de uma água natural para facilitar e acelerar o desenvolvimento de uma boa fauna de protozoários. Finalmente, cada pessoa interessada deve experimentar e adquirir experiência própria com esse método.

Mais simples é, buscar uma porção de uma água natural da vizinhança e investigá-la através do microscópio. Assim pode-se conhecer diretamente, que tipos de microorganismos encontram-se nas águas, as quais nós passamos no dia-a-dia. Não é bom usar uma rede para essa tarefa – por várias razões: Primeira, quase todas as redes comuns deixam passar não apenas a maioria das bactérias e dos nanoplânctons mas também uma certa parte do microploâncton. Na segunda razão, a concentração (pela rede) de organismos, que precisam respirar, junto com o decréscimo da concentração do oxigênio por causa do aumento da temperatura da amostra de fora do seu ambiente natural reduz drasticamente o acesso ao oxigênio, o que aumenta rapidamente a mortalidade dos planctones. Na terceira razão, a concentração pela rede machuca e mata muitos dos planctones, que não estão mais acessíveis para serem observados vivos, e, além disso, os cadáveres no processo da sua degradação consomem muito oxigênio e, às vezes, também liberam substâncias tóxicas, o que acelera a matança nas amostras de plâncton. Portanto, recomenda-se buscar simplesmente amostras da água natural com a sua concentração natural dos seus planctones. Para evitar uma rápida redução de oxigênio nas amostras, recomenda-se encher os recipientes de transporte apenas à metade ou, no máximo, a duas terças partes do seu volume – especialmente durante o verão e/ou quando a volta ao laboratório dura algumas horas. Para o transporte recomendam-se recipientes de vidro (de laboratório), com uma abertura ampla, e com uma tampa com rosca bem ajustada, mas não de plástico, porque a maioria dos plásticos libera substâncias tóxicas na água. Para evitar um rápido aumento da temperatura é bom, colocar os recipientes durante o transporte em caixas com isopor ou pelo menos com jornais em volta, talvez também com pequenos blocos de gelo, e protege-los da insolação direta. Nas áreas tropicais, e na área sulbrasileira pelo menos nas estações quentes do ano, também com todas estas precauções, o transporte não pode durar mais do que meio dia para evitar uma perda drástica dos protistas nas amostras.

Imediatamente depois da viagem, numa sala com ar condicionado (temperatura em volta de 20°C), temos que abrir as tampas para permitir acesso ao oxigênio. – A composição dentro de uma amostra, isolada do seu ambiente natural, muda mais ou menos rapidamente: alguns componentes começam logo a desaparecer gradualmente (morrendo por causa de subnutrição ou são consumidos por outros planctones), enquanto outros podem aumentar a sua população durante algum tempo, para depois também desaparecerem. Por isso, a investigação das amostras com organismos vivos tem que ser realizada pelo menos dentro de poucos dias após a sua coleta. Por isto, não é prática coletar no mesmo tempo muitas amostras a fim de estudos de protistas vivos.

ISOLAMENTO DE CLONES DE PROTISTAS

Se é encontrado um espécime de protista numa preparação microscópica, e a posição taxonômica dele tem que ser investigada, normalmente ele morrerá antes de conhecer-se, qual é a sua espécie. Geralmente precisa-se de vários indivíduos para identificar uma espécie com certeza. Para garantir que os indivíduos investigados possuem geneticamente os mesmos caracteres taxonômicos, necessita-se de clones cultivados em condições bem conhecidas e controladas. O método aplicado aqui chama-se de "cultivo paralelo", que pode ser usado tanto para fins taxonômicos quanto para estudos ecológicos/fisiológicos.

O método mais simples para iniciar "clones" é o "isolamento" por meio de pipetas capilares sob estereomicroscópio com aumento adequado (normalmente entre 10 e 60 vezes) e iluminação transmitida.

Para uma produção própria de pipetas capilares usa-se pipetas normais (de Pasteur) ou tubos de vidro de um diâmetro de cerca de 7 mm e uma chama forte de gás (cuidado: circulação de ar no lugar e/ou umidade elevada podem dificultar seriamente a fabricação de pipetas capilares!). Segura-se o corpo da pipeta em uma mão e gera-se a boca da pipeta na chama. Depois pega-se a ponta da pipeta com uma pinça, na outra mão, e puxa-se no sentido longitudinal. Pontos críticos nesse processo são: puxar o capilar no momento certo (quando o vidro tem o grau certo de moleza) e com a força e na direção certa. Puxando com força excessiva, o capilar será fino demais ou quebra; com pouca força o capilar fica grosso demais; e na direção errada, forma um capilar torto. Normalmente precisa-se de treinamento prévio para aprender a fazê-lo corretamente. O diâmetro do capilar tem que estar ajustado ao tamanho do protista, que se pretende isolar – geralmente um pouco maior do que aquele.

Para certos protistas grandes, especialmente para espécies sem parede forte (p. ex., certos ciliados), a boca do capilar tem que ser arredondada na chama de gás para não matar o protista, quando o mesmo entra no capilar. Aqui aparece uma outra dificuldade: a ponta da pipeta capilar tem que ser puxada rapidamente através da chama, mas não rápido demais, a fim de que o tempo da pipeta dentro da chama seja suficiente para amolecer e arredondar a borda; mas se a ponta do capilar permanece tempo excessivo na chama, o vidro amolece demais e fecha a boca. O resultado de cada tentativa tem que ser controlado na lupa. Arredondar a boca do capilar necessita de uma certa experiência e paciência – mas o esforço vale a pena!

Começa-se o processo de isolamento com uma pequena parte da amostra total, dentro de uma placa de Petri ou, melhor, dentro de uma taça de vidro com um diâmetro de cerca de 10cm e uma altura máxima de 4cm; encher apenas à metade. Controla-se a amostra no estereomicroscópio e procura-se protistas, que são de interesse. Para espécies de tamanhos normais ou pequenos serve simplesmente a "força capilar" para sugar os protistas para dentro da pipeta, e não precisa-se usar o bulbo de borracha da pipeta para isso. Usa-se o bulbo somente para liberar o conteúdo do capilar num outro recipiente ou para capturar protistas grandes, porque capilares com diâmetros maiores possuem uma menor força capilar, enquanto proto-

zoários maiores muitas vezes têm uma motilidade muito mais forte para escapar da caça. Libera-se os protistas capturados, sob controle pela lupa, para dentro de uma tacinha pequena de vidro, com cerca de 40mm de diâmetro e de 16mm de altura, já com meio de cultura. Se os protistas alteram drasticamente o tipo dos seus movimentos ou sua forma ou seu plasmalema rebenta, o meio de cultivo testado está inapropriado.

Para o isolamento propriamente dito necessita-se de vários ou até muitos indivíduos de cada espécie desejada. Na primeira etapa, o "pré-isolamento", com cada pipetação entram também outros componentes da amostra, junto com os protistas desejados, especialmente, se a amostra é rica em fito-planctontes. Assim encontram-se na tacinha do pré-isolamento uma mistura de vários protistas desejados e de muitos indesejados. Por isso, depois é necessário um isolamento verdadeiro.

A princípio, o isolamento é um tipo de diluição em passos sucessivos para perder todos os componentes não desejados. Existem várias possibilidades para isso. Para espécies grandes e bem móveis pode-se usar uma série de tacinhas: todos os protistas desejados são pipetados da primeira para a segunda, depois todos desejados da segunda para a terceira tacinha, e, assim, sucessivamente. Para espécies menores recomenda-se o uso de uma "série de gotas" do meio de cultivo no fundo de uma placa de Petri. Todas as passagens de uma série têm que ser realizadas imediatamente uma depois da outra, para que protistas indesejados não tenham chance de se multiplicar em períodos entre as passagens. Durante as mesmas perdem-se não apenas planctontes não desejados mas também protistas desejados: alguns morrem no processo da pipetação; outros grudam na parede da pipeta; outros ficam escondidos nos cantos das tacinhas ou gotas ou são confundidos com grãos de pó ou detrito. Dependendo do tamanho da espécie, da delicadeza do seu córtex e da motilidade, permanecem, em geral, apenas 1/3 até 1/20 do número inicial dos indivíduos capturados. Para controlar o grau de perda, conta-se os indivíduos reencontrados em cada passagem. Dependendo dos fatores indicados acima, precisa-se de 4 a 8 (ou mais) passagens (normalmente bastam 6 passagens), para que a espécie desejada fique livre de outros organismos eucarióticos. Tem que se começar com um número adequado já no pré-isolamento. Porém, se a espécie a ser isolada tem uma camada externa de mucilagem, na qual grudam outros protistas, o processo de isolamento é muito mais difícil e tem que ser repetido várias vezes, até obter-se clones limpos.

O último passo do isolamento é o seguinte: coloca-se numa tacinha uma única gota de meio; tira-se um espécime da última tacinha ou gota da série de isolamento e inocula-se o mesmo nessa nova gota. Ai verifica-se que realmente apenas um único protista entrou nela; caso contrário precisa-se tirar todos os demais indivíduos da gota. Depois, completa-se a tacinha com meio de cultura até a metade do seu volume. Assim prepara-se 3 ou 6 tacinhas paralelamente para cada espécie, sendo cada 3 dessas tacinhas colocadas juntas numa placa de Petri (diâmetro de cerca de 10 cm). Etiquetas nas placas de Petri têm que indicar a espécie ou pelo menos o tipo de protista, o lugar da sua coleta, o tipo de meio de cultura e da alimentação, se for necessário, e a data da inoculação. Se os protistas possuem plastídios ou simbiontes fotossintéticos, coloca-se as placas de Petri com estes numa estante com iluminação adequada (lâmpadas fluorescentes) – nunca diretamente ao Sol! Se os protistas são

suspeitos de serem fagotróficos, tem-se que suplementar as tacinhas com uma alimentação adequada (veja mais adiante).

Os protistas isolados serão deixados para se propagarem e formarem clones, mas é preciso controlar as tacinhas, na época inicial, a cada dia. Se eles não se multiplicam, componentes do modo de cultivo (composição do meio, pH, salinidade, alimentação, iluminação, temperatura) são inapropriados. Nesse caso precisa-se experimentar e adaptar as condições do cultivo às necessidades do protista a ser cultivado.

Às vezes aparecem contaminações e um "re-isolamento" é necessário. - Quando os protistas são apropriadamente limpos, eles serão mudados para recipientes maiores, para o cultivo de rotina, de estoque. Por exemplo, em frascos de Erlenmeyer de 100 a 300 ml ou em taças de 10 cm de diâmetro (cerca de 150 ml volume bruto). Estes recipientes devem ter tampas apropriadas, que evitem a entrada de germes estranhos, mas permitam intercâmbio de gases. O tipo de recipiente para o cultivo de estoque depende das necessidades do protista (tipo de alimentação, frequência da renovação do meio).

O isolamento por meio de pipetas capilares é muito eficiente para protistas grandes, móveis e/ou planctontes e também é aplicável para flagelados pequenos. Porém, para protistas pequenos e imóveis, esse método torna-se difícil, porque aqueles facilmente podem ser confundidos com grãos de pó ou detritos no meio, ou ficarem grudados nas paredes do recipiente. O maior grau de dificuldade, para o isolamento por pipetagem, ocorre para estágios encistados de certos protozoários pequenos e para pequenas amebas com movimentos muito lentos.

Para protistas (mais ou menos) imóveis e especialmente para os fotossintéticos, existe uma outra técnica de isolamento: prepara-se placas de Petri com agar, semelhantes aquelas usadas para isolamentos de bactérias, adicionando 1 a 2% de agar a um meio líquido adequado. Na superfície do agar na placa distribui-se uma gota da amostra ou, melhor, de um "pré-isolado", por meio de uma espátula de vidro. Depois expõe-se a placa a uma iluminação adequada. Protistas fotossintéticos propagam-se na superfície do agar formando agregações ("colônias") de células. Uma variação desse modo de isolamento é uma dispersão por borrifado da amostra (ou de um pré-isolado) em microgotas com ar pressurizado e esteril-filtrado, sobre a superfície de placas de agar, através de um injetor. Na primeira tentativa, estas duas técnicas normalmente ainda não fornecem clones limpos, e, assim, um ou vários re-isolamentos em placas de agar são necessários. Com essas duas técnicas é possível realizar isolamentos de formas cocais de clorofíceas e de diatomáceas, por exemplo, mas também de protistas fotossintéticos e normalmente monadais, que possuem a capacidade de formar estágios cocais ou encistados, como espécies de *Chlamydomonas* ou de alguns outros volvocínios.

Para alcançar culturas livres também de bactérias, precisa-se de técnicas, produtos químicos e equipamentos mais sofisticados, p. ex., esteril-filtração do meio de cultura e/ou adição de antibióticos e trabalhar com as culturas abertas, exclusivamente dentro de uma "capela de fluxo laminar".

MEIOS BÁSICOS PARA O CULTIVO DE PROTISTAS DE ÁGUA DOCE

Quase todos os protistas vivem num ambiente aquático ou pelo menos periodicamente molhado. Assim, recomendam-se soluções como meio de cultivo. Um meio básico usado no laboratório do presente autor é o "meio D". Este originalmente foi desenvolvido para o cultivo de desmíofíceas (SCHLÖSSER, 1982). Porém, numa forma um pouco modificada (Tabelas I a IX) esse meio é bom ou pelo menos suficiente, para a maioria dos protistas fototróficos de água doce.

Tabela I: "Meio D" (versão modificada)

Componentes/tratamentos:	1 L meio	4,5 L meio
1. Água destilada	932 ml	4.194 ml
2. Extrato de terra (veja Tab. II)	30 ml	135 ml
3. Solução Ia (veja Tab. III)	10 ml	45 ml
4. Solução VII (veja Tab. XII)	2 ml	9 ml
5. Solução IIIb (veja Tab. V)	0,5 ml	2,5 ml
6. Solução IIIa (veja Tab. VI)	4,5 ml	20,0 ml
7. "Mix 8" =IV (veja Tab. VII)	1,0 ml	4,5 ml
8. Autoclavar: 20min. à 120°C (2 atm).		
9. Deixe resfriar-se -- depois suplementar com		
10. Solução Ib (veja Tab. VIII)	10 ml	45 ml
11. Solução V (veja Tab. IX)	10 ml	45 ml

Tabela II: Extrato de Terra

1. Terra vegetal ou turfosa, de uma mata, com bastante ácido húmico, sem agrotóxicos	2.000 ml
2. Água destilada	3.500 ml
3. Autoclavar 60-80 min, à 120°C (2 atm.).	
4. Deixe resfriar-se -- depois	
5. decantar e filtrar a solução através de um filtro de papel.	
6. Distribuir o extrato, cada vez 700 ml, em frascos de 1.000 ml.	
7. Autoclavar de novo, deixe resfriar-se, e estocar na geladeira.	

Tabela III: Solução Ia (de sais nutritivos)

1. $MgSO_4$	1 g
2. KNO_3	10 g
3. Água destilada	1.000 ml

4. Autoclavar 20 min. à 120°C (2 atm.).
5. Deixe resfriar-se – estocar (possível fora da geladeira).

Tabela IV: Solução II

1. Água destilada	cerca de 1 litro
2. $CaSO_4$	– em excesso, mais do que se resolve na água, para formar uma solução saturada.
3. Estocar na mesa	

Tabela V: Solução IIIb (de ferro)

	1.000 ml ^x	250 ml ^x
1. Água destilada	1.000 ml	250 ml
2. NaEDTA (=Titriplex III MERCK)	4 g	1 g
3. $FeSO_4 \cdot 7H_2O$	7 g	1,75 g

4. Autoclavar 20 min. à 120°C (2 atm.).
5. Deixe resfriar-se – estocar na geladeira.

- x) Infelizmente, essa solução envelhece dentro de poucos meses, por isso, recomenda-se preparar cada vez apenas uma pequena quantidade (250 ml); quando a cor da solução muda, de inicialmente amarela para marrom clara, por causa da oxidação de Fe^{2+} em Fe^{3+} , a solução IIIb não serve mais para preparar meios de cultivo.

Tabela VI: Solução IIIa (de metais traços) (preparada em duas etapas)

"Estoque I" – resolva separadamente:		No "estoque II"	
a) cada vez em 100 ml água dest.:		entram cada vez:	
1.	ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0,1 g	→ 1 ml
2.	MnSO ₄ ·4H ₂ O	0,1 g	→ 2 ml
3.	H ₃ BO ₃	0,2 g	→ 5 ml
b) cada vez em 100 ml água destl.:			
4.	Co(NO ₃) ₂ ·6H ₂ O	0,2 g	→ 5 ml
5.	Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0,2 g	→ 5 ml
6.	CuSO ₄ ·5H ₂ O	0,005 g	→ 1 ml
c) "Estoque II" usado para o meio			19 ml
7.	Água destilada		981 ml
8.	NaEDTA (= Titriplex III MERCK)		0,4 g
9.	Suplementar com as soluções do "estoque I"		19 ml
10. Autoclavar 20 min. à 120°C (2 atm.).			
11. Deixe resfriar-se – estocar na geladeira.			

Tabela VII: Solução IV (= "MIX 8") (de elementos traços)

1.	Água destilada	1.000 ml
2.	KBr	22,00000 g
3.	KJ	0,02000 g
4.	LiCl	0,00006 g
5.	RbCl	0,00061 g
6.	SrCl ₂	0,38000 g
7.	AlCl ₃ (não inspirar: tóxico)	0,03000 g
8. Autoclavar 20 min. à 120°C (2 atm.).		
9. Deixe resfriar-se – estocar na geladeira.		

Tabela VIII: Solução Ib (de um sal nutritivo)

1.	Água destilada	1.000 ml
2.	KH ₂ PO ₄	1 g
3. Autoclavar 20 min. à 120°C (2 atm.).		
4. Deixe resfriar-se – estocar na mesa.		

Tabela IX: Solução V (de vitaminas)

a) Resolva em água destilada autoclavada	700 ml
1. Thiamine	100 mg
2. Ácido nicotínico	20 mg
3. Pantotenato de cálcio	20 mg
4. Ácido p-aminobenzoico	2 mg
5. Biotín	0,2 mg
6. Inositol (myo-inositol)	1.000 mg
7. Ácido fólico	0,4 mg
b) Resolva em água destilada separadamente.	300 ml
8. Thymine	600 mg
9. Esquente na estufa – sem ferver, para que a substância se dissolva.	
10. Deixe resfriar-se – junte com a primeira parte (a).	
11. Vitamina B ₁₂ (como cianocobalmin)	0,4 mg
12. Estoque na geladeira – ou, melhor, em porções a serem usadas na preparação dos meios, no freezer, em frascos escuros.	

Para muitos protistas fagotróficos a concentração de alguns componentes daquele meio, especialmente do nitrato e dos metais pesados, como usado para protistas fotossintéticos, é alto demais, especialmente para rizópodes. Por isso, recomenda-se uma redução desses componentes. Na literatura científica encontram-se muitos meios especiais. No entanto, achou-se um modo mais simples, mas também muito eficiente: diluir o meio D e suplementar os novos meios com certos componentes. Assim, uma série de meios mais diluídos foram criados no laboratório do autor: "D/4", "D/8A", e "D/8B" (Tabelas X a XV). Meio D/4 é bom para protistas fotossintéticos de águas menos ricas em nitrato. Os meios D/8 podem ser usados também para certos protistas fototróficos, mas são bons especialmente para a maioria dos protistas fagotróficos, os "protozoários *sensu stricto*", da água doce.

Tabela X: "Meio D/4A"

Componentes/tratamentos	1 L meio	2 L meio
1. Água destilada	705 ml	1.410 ml
2. Meio D completo (veja Tab. I)	250 ml	500 ml
3. Solução VI (veja Tab. XI)	10 ml	20 ml
4. Solução VIII (veja Tab. XII)	15 ml	30 ml
5. Autoclavar 20 min. à 120°C (2 atm.)		
6. Deixe resfriar-se – depois suplementar com		
7. Solução Ib (veja Tab. VIII)	10 ml	20 ml
8. Solução V (veja Tab. IX)	10 ml	20 ml

Tabela XI: Solução VI

1. Água destilada	1.000 ml
2. NaCl	5,0 g
3. KCl	0,4 g
4. NaHCO ₃	0,4 g
4. Autoclavar 20 min. à 120°C (2 atm.).	
5. Deixe resfriar-se – pode estocar na mesa.	

Tabela XII: Solução VII

1. Água destilada	1.000 ml
2. CaO em excesso, mais do que se dissolve – pode estocar na mesa.	

Tabela XIII: “Meio D/8A” (ácido: pH ~ 6,3)

Componentes/tratamentos	1 L meio	2 L meio
1. Água destilada	825 ml	1.650 ml
2. Meio D completo (veja Tab. I)	125 ml	250 ml
3. Solução VI (veja Tab. XI)	10 ml	20 ml
4. Solução VIII (veja Tab. XV)	20 ml	40 ml
5. Autoclavar 20 min. à 120°C (2 atm.).		
6. Deixe resfriar-se – depois suplementar com		
7. Solução Ib (veja Tab. VIII)	10 ml	20 ml
8. Solução V (veja Tab. IX)	10 ml	20 ml

Tabela XIV: “Meio D/8B” (básico: pH~7,7)

Componentes/tratamento	1 L meio	2 L meio
1. Água destilada	838 ml	1.676 ml
2. Meio D completo (veja Tab. I)	125 ml	250 ml
3. Solução VI (veja Tab. XI)	10 ml	20 ml
4. Solução VII (veja Tab. XII)	7 ml	14 ml
5. Autoclavar 20 min. à 120°C (2 atm.).		
6. Deixe resfriar-se – depois suplementar com		
7. Solução Ib (veja Tab. VIII)	10 ml	20 ml
8. Solução V (veja Tab. IX)	10 ml	20 ml

Tabela XV: Solução VIII

1. Água destilada	1.000 ml
2. $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,54 g
3. $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot 1\text{H}_2\text{O}$	0,10 g
4. Autoclavar 20 min. à 120°C (2 atm.).	
5. Deixe resfriar-se – pode estocar na mesa.	

Outros meios/métodos mais ou menos simples para um cultivo de protozoários são descritos por vários autores, p. ex., CHU (1942), MAYER (1971), STARR (1971), STREBLE & KRAUTER (1981). Certos protistas têm exigências muito especiais e, portanto, precisam de meios especiais (que não podem ser listados aqui), p. ex., para protistas de habitats anaeróbicos, para certos dinoflagelados e certos euglenídeos. Meios simples para protistas marinhos são baseados em água do mar e suplementados de modo parecido com o meio D. Para organismos de águas salobras a água do mar é diluída adequadamente com água destilada e também suplementada com nutrientes (JEBRAM, 1977a, b; VIEIRA, 1977).

ALIMENTAÇÃO LABORATORIAL DE PROTISTAS FAGOTRÓFICOS

Para protozoários existem dois tipos de alimentos básicos: (1) bactérias, e (2) “algas” unicelulares (=protistas fototróficos). Com um pouco mais de experiência observa-se ainda a necessidade de aplicar outros tipos de dietas: p. ex., (3) uma combinação de bactérias e algas unicelulares, ou (4) outros protistas fagotróficos.

(1) Exclusivamente bactérias servem de alimentos para vários pequenos flagelados, amebas e ciliados. Se não pretende-se fazer experimentos, que exijam um controle exato dos fatores e da alimentação, pode-se usar misturas de várias bactérias, que propagam-se facilmente a base de fermentação de certos materiais orgânicos. Antigamente, pequenos pedaços de queijo ou de um certo tipo de nabo ou grãos de certos cereais ou extrato de feno foram usados para iniciar o desenvolvimento de bactérias para alimentar protozoários num cultivo rotineiro. Porém, os queijos atualmente produzidos em fábricas contêm substâncias desfavoráveis para um cultivo de protistas. Aquele tipo de nabo quase desapareceu dos mercados; e também o acesso ao feno é difícil hoje em dia. No entanto, apareceu para venda um “pó de ovo”, que foi fácil utilizar no laboratório; mas atualmente é difícil encontrar aquele pó de ovo. Por isso, em nosso laboratório há muitos anos usa-se gema de ovo de galinha, cozida e esmagada em pequenos pedaços, armazenada num pequeno frasco de vidro fechado no freezer. Para o uso no cultivo de protistas, pequenos pedacinhos serão fervidos

em meio D/8 para matar esporos de fungos e bactérias indesejadas; depois de resfriados, serão pipetados nos recipientes de cultivo em quantidades variadas dependendo da exigência do protista. Hoje em dia, ovos normalmente são produzidos industrialmente, aplicando hormônios, antibióticos e alimentos contaminados com agrotóxicos às galinhas em quantidades, sendo que essas substâncias tóxicas permanecem também nos ovos. Por isso, ovos comuns dos mercados não servem mais para o cultivo de protozoários! Tornou-se necessário procurar ovos de galinhas, que vivem livremente no campo e não estão expostas a altas taxas de agrotóxicos. Mais fácil, atualmente, é o acesso aos nabos redondos brancos ou rabanetes brancos (rabanetes pretos ou vermelhos não servem); parece que nabos ainda não são tratados com muitos agrotóxicos. Bem limpos e cortados em pedacinhos de cerca de meio centímetro cúbico ou menos e bem secados podem ser estocados num pequeno frasco com tampa, fora da geladeira. Antes do uso para o cultivo de protistas, os pedacinhos serão fervidos em meio D/8B para matar germes não desejados e deixados a resfriar. – Nesse contexto precisa-se cuidar de um problema especial: Os produtos da fermentação de substâncias orgânicas pelas bactérias são ácidos e, portanto, baixam o pH do meio; e alguns desses produtos são também tóxicos em concentrações elevadas. Por isso, o volume da suplementação de substâncias orgânicas tem que ser bem controlado e verificado experimentalmente para cada espécie de protozoários a ser cultivada.

(2) Exclusivamente com algas unicelulares provavelmente nenhum protista fagotrófico consegue sobreviver (se o meio de cultivo não contém as substâncias nutrientes necessárias, especialmente vitaminas, em solução). Porém, em cultivos não-axênicos, que contêm uma certa população de bactérias como contaminação natural, podem ser mantidos vários protozoários, especialmente certos ciliados, com algas unicelulares, pelo menos por algum tempo.

Antigamente, espécies de diatomáceas e volvocinios (p. ex., de *Nitzschia*, *Chlamydomonas*, *Dunaliella*, *Gonium*) foram usados nos laboratórios como alimentos rotineiros para organismos fagotróficos. No entanto, verificou-se que aquelas algas não são suficientes para muitas espécies consumidoras. O autor atual descobriu que espécies de certas prasinofíceas, que não possuem uma parede celular forte (p. ex., espécies de *Nephroselmis*, *Heteromastix*, *Pyramimonas*) e algumas primnesiofíceas (p. ex., certas espécies de *Isochrysis*, *Pavlova*, *Chrysochromulina*) são bem melhor alimento, tanto para vários metazoários, como para protozoários (JEBRAM, 1980a, b, 1984, e muitos resultados ainda não publicados). Certos consumidores realmente necessitam de diatomáceas na sua dieta (p. ex., certas espécies de testáceos e foraminíferos). Há mais de 20 anos, HAUENSCHILD (1968) observou que "*Cryptomonas*" spp. (um criptomonadínio vermelho) é uma boa dieta para vários organismos fagotróficos. Em numerosas séries de experimentos, o presente autor encontrou que os resultados corresponderam às observações de HAUENSCHILD, mas também foi descoberto que acima de uma certa concentração na dieta, criptomonadínios vermelhos podem causar efeitos tóxicos para vários consumidores (JEBRAM, 1980a, b, 1982, e muitas observações não publicadas). No entanto, encontrou-se um outro tipo de criptomonadínio, que é verde e não causa efeitos tóxicos mas é bem aceito como

alimento por muitos consumidores, tanto metazoários quanto protozoários. Assim, espécies de *Chroomonas* e *Hemiselmis virescens*, respectivamente, são bons componentes nas dietas de muitas amebas, heliozoários, flagelados fagotróficos e ciliados, de água doce, salobra ou marinha respectivamente (vários resultados próprios ainda não publicados).

(3) Muitos protozoários realmente necessitam tanto de algas unicelulares como de muitas bactérias na dieta, portanto, de um material para acelerar a propagação de bactérias, como pedacinhos de ovo ou nabo, no cultivo laboratorial (p. ex., várias espécies de amebas, testáceos e ciliados). Alguns protozoários podem ser cultivados exclusivamente com bactérias, mas, quando têm acesso às algas adequadas, eles também as utilizam como alimento; parecem mais saudáveis com essa dieta mista.

(4) Vários protozoários vivem saudavelmente e propagam-se bem somente se tiverem uma dieta mais complexa, de pelo menos três componentes principais: bactérias, algas unicelulares e também outros protistas fagotróficos, especialmente ciliados. Uma dieta mista de *Chroomonas caudata* com *Tetrahymena* spp. ou *Colpidium* spp. (ciliados) ou com *Chilomonas paramecium* (criptomonadídio fagotrófico), suplementados de bactérias a base de ovo, foi provado ser muito eficiente para o cultivo daqueles protozoários mais exigentes da água doce. Na maioria são espécies grandes, como *Amoeba proteus*, vários heliozoários e *Blepharisma japonica*, que precisam de uma alimentação mista desse modo. — Além disso, existem vários protozoários, p. ex., ciliados e foraminíferos, que comem (quase) exclusivamente outros ciliados (ou pequenos metazoários, p. ex., rotíferos ou copépodos).

Assim, o cultivo de várias espécies entre os protozoários exige um tratamento muito mais complicado do que no cultivo de protistas fototróficos, porque precisa-se instalar uma pequena cadeia alimentar no laboratório!

Finalmente, deve-se mencionar que, para experimentos fisiológicos, que exigem controle total dos fatores, meios de cultura suplementados com vitaminas, aminoácidos, nucleo-ácidos, sacarídios e/ou outras substâncias orgânicas e, às vezes, antibióticos, foram desenvolvidos, servem para o cultivo de protistas sem a presença de outros organismos como alimento. Desse modo, protistas principalmente fagotróficos estão forçados a alimentar-se via pinocitose e osmotrofia de substâncias dissolvidas em concentrações controladas, num "cultivo axênico". Meios desse tipo foram desenvolvidos, p. ex., para certas espécies de amebas, de *Monas*, *Tetrahymena* e *Paramecium* (além de vários protozoários parasíticos e simbióticos). Porém, aquele modo de cultura exige condições, que estão normalmente fora do alcance de alguém, que começa a trabalhar com cultivo de protistas.

COMBATE CONTRA INFECÇÕES NOS CULTIVOS

Numerosas espécies de protistas procarióticos e eucarióticos, de fungos e mesmo de alguns metazoários, podem formar estágios encistados, que são resistentes ao dessecação e a temperaturas elevadas e distribuídos pelo vento, podem entrar nos recipientes de cultivo de protistas, quando estes estão abertos durante certos procedimentos. Esses infectantes indesejados normalmente competem pelos alimentos com os protistas desejados, propagam-se mais rapidamente do que aqueles, e, às vezes, os usam como alimentos.

Normalmente é bom combater o desenvolvimento de bactérias naquelas culturas, nas quais os protistas não precisam delas como alimento. Outros "hóspedes" indesejados são certas formas cocais de clorofíceas, como espécies de *Pleurococcus* e *Chlorella*, ou estágios cocais de *Chlamydomonas*, porque eles se multiplicam relativamente rápido e entram facilmente nas culturas aqui no Brasil, porém, pouco ou nunca, servem como alimentos para outros protistas. Também, com relativa freqüência, pode-se encontrar espécies de *Monas* (crisofíceas fagotróficas), que, quando entram numa cultura, comem tanto as bactérias como protistas fototróficos até, às vezes, fagotróficos, enquanto elas mesmas são mais ou menos tóxicas para outros consumidores potenciais e, portanto, ficam como os últimos no recipiente; parece que, na região da área sul do Brasil, *Monas*, felizmente, é relativamente menos freqüente a dispersão através do ar, do que na Europa. Piores, e aqui no Brasil muito comuns, são fungos microscópicos: muitos deles produzem substâncias venenosas não apenas para bactérias mas também para muitos dos protistas eucarióticos; além disso, alguns deles realmente caçam e alimentam-se de protistas (e/ou pequenos metazoários!). Relativamente com muito menos freqüência ocorrem infecções por pequenas amebas ou por ciliados (p. ex., espécies de *Naegleria*, *Colpoda*, *Paramecium*). — Em geral, aqui no Brasil, os perigos mais comuns para infecções em cultivos de protistas são, além de bactérias, fungos microscópicos e algas clorococais.

Precisa-se combater o perigo de infecções já no início de um cultivo via esterilização dos meios de cultura. Existem três métodos de esterilizar um meio: O melhor é a "esteril-filtração", porque ela evita uma desnaturação de vitaminas, aminoácidos etc., que podem ocorrer pelas temperaturas altas aplicadas nos outros dois métodos. Infelizmente, a esteril-filtração gasta muito tempo e precisa de equipamentos especiais (como filtros especiais, portas-filtros especiais, bombas especiais). O método mais comum é a "autoclavagem" (2 atm, 120°C, 20 min). A última opção, para pesquisadores, que não têm acesso à equipamentos sofisticados, é "ferver" o meio por alguns minutos; porém, mesmo assim, certos germes mais resistentes podem ainda sobreviver. Os dois últimos métodos de esterilização, especialmente o de ferver, têm a desvantagem de eventualmente alterar a composição química pelas temperaturas altas; e o pH e o valor osmótico podem também mudar. (Antes do uso para novo cultivo, o meio deve ter se resfriado.)

Não é recomendável, suplementar meios de cultivo de rotina com antibióticos, porque os mesmos têm, ou podem ter desconhecidamente, efeitos colaterais negativos

também nos protistas desejados. Além disso, um amplo uso de antibióticos aumenta a chance do desenvolvimento de resistências nos organismos, que nós pretendemos combater. Antibióticos recomendam-se apenas em casos absolutamente necessários, como para o cultivo axênico, mas nele também somente com muita cautela.

MONTAGEM DE UMA LÂMINA PARA A MICROSCOPIA DE PROTISTAS VIVOS

A observação de protistas vivos no microscópio tem muitas vantagens – também para estudos da taxonomia. Para muitos protozoários, o tipo de movimento é mais ou menos característico para uma espécie ou um grupo taxonômico, a que pertence. E muitos detalhes morfológicos também são melhor ou mais facilmente visualizados, quando o organismo está bem vivo (além das vantagens, que a microscopia eletrônica nos apresenta a respeito de outros detalhes).

No passado foi tentado reduzir a motilidade de protozoários em preparações microscópicas por meio de glicerina ou vários tipos de mucilagens, mas aquelas substâncias, nas concentrações necessárias para alcançar o efeito desejado, normalmente matam os protistas, porque se tornam tóxicas ou aumentam demais o valor osmótico do meio. – Para evitar que o protista se movimente demais mas que continue vivo precisa-se de uma técnica especial de montar a lâmina, na observação microscópica. Os passos são os seguintes:

(1) Limpar bem a lâmina e a lamínula; (2) colocar uma pequena gota do meio com os protistas na lâmina; (3) raspar com os quatro cantos da lamínula pequenos "pezinhos" de "plastilina" (=massa de modelar, usada para formar pequenas figuras pelas crianças) de um estoque de plastilina, todos na mesma face da lamínula; (4) colocar a lamínula com os seus "pezinhos" na lâmina por sobre a gota da amostra; (5) apertar a lamínula contra a lâmina pressionando com um instrumento pontiagudo (p. ex., pinça, lápis) junto a cada um dos pezinhos numa seqüência cíclica, até que os protozoários quase fiquem parados, mas ainda tenham a possibilidade de mover-se um pouquinho – isso tem que ser acompanhado e controlado sob um microscópio, em pequeno aumento. Os pezinhos de plastilina têm várias tarefas importantes: eles mantêm uma distância quase constante, como nós a instalamos; eles conseguem manter os protistas quase presos sem matá-los; se for corretamente montado, eles mantêm a lamínula no mesmo lugar sobre a lâmina, quando se usa óleo-de-inersão entre a objetiva e a lamínula e se mudar a posição da lâmina em relação a objetiva (sem pezinhos, deslocando a lâmina, muda o lugar relativo da lamínula por causa da força adesiva do óleo e, com isso, também dos objetos entre lâmina e lamínula). Apenas com os pezinhos pode-se regular a distância entre lâmina e lamínula como é preciso para quase fixar os protistas (fixar demais aumenta a probabilidade de que os protistas morram logo!). Para conseguir isso, precisa-se de certos cuidados: a gota

da amostra tem que ser suficientemente pequena para que a água não chegue cedo demais nos lugares, onde os pezinhos têm que grudar na lâmina – em lugares molhados a plastilina não consegue se fixar; os pezinhos mesmos também têm que ser muito pequenos, para que seja possível apertar a lâminula suficientemente (pezinhos grandes demais não permitem isso!).

Finalmente, pode-se salientar, que este mesmo método de montar uma lâmina com lamínula para a observação microscópica é aplicável também para pequenos metazoários.



Fig. 1: Fotografia mostrando uma parte de uma das Salas de Culturas no Laboratório de Protistologia da PUCRS.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- CHU, S., 1942. The influence of the mineral composition of the medium on the growth of planktonic algae. I. Methods and Culture Media. *J. Ecol.* 30: 284-325.
- HAUENSCHILD, C., 1968. Hälterung und Laboratoriumszuchten von Invertebraten. In: C. SCHLIEPER, C. (ed.), *Methoden der meeresbiologischen Forschung*, pp. 192 – 209. VEB Gustav Fischer Verlag, Jena.
- JEBRAM, D. 1977a. Experimental techniques and culture methods. In: WOOLLACOTT R. M., and ZIMMER, R. L. (eds.), *Biology of Bryozoans*, pp. 273-306. Academic Press, New York.

- JEBRAM, D. 1977b. Culture media and diets for Bryozoa. In: RECHCIGL M., Jr. (ed.), *CRC-Handbook-Series in Nutrition and Food*, Sec. G, vol. II, pp. 77-92. CRC-Press Inc., Cleveland/Ohio.
- JEBRAM, D., 1980a. Prospection for a sufficient nutrition of the cosmopolitan marine bryozoan, *Electra pilosa* (Linnaeus). *Zool. Jahrb. Syst. Ökol. Geograph. Tiere*, Stuttgart, 107: 368-390.
- JEBRAM, D., 1980b. Laboratory diets and qualitative nutritional requirements for bryozoans. *Zool. Anz.*, Jena, 205: 333-344.
- JEBRAM, D. 1982. Interpretations of the results of feeding experiments regarding physiology, ecology, and phylogeny of the Bryozoa. *Zool. Anz.*, Jena, 208: 405-416.
- JEBRAM, M., 1984. Zur Ernährungsbiologie benthischer Foraminiferen. *Archiv für Protistenkunde*, 128: 295-298.
- MAYER, M., 1971. *Kultur und Präparation der Protozoen*. Franckh'sche Verlagshandlung, Stuttgart.
- SCHLÖSSER, U. G., 1982. List of Strains (Sammlung von Algenkulturen). *Ber. Deutsch. Botan. Gesellsch.* 95: 181-276.
- STARR, R. C., 1971. Algal cultures, sources and methods of cultivation. In: SAN PIETRO, A. (ed.), *Methods in Enzymology* pp. 29-53. Academic Press, New York.
- STREBLE, H., & KRAUTER, D., 1981. *Das Leben im Wassertropfen. Mikroflora und Mikrofauna des Süßwassers*. pp. 1-336, Taf. 1-27. Franckh'sche Verlagshandlung, Stuttgart.
- VIEIRA, A. A. H., 1977. Métodos de cultura de algas do plâncton marinho: estudos realizados nas regiões de Cananêia e de Ubatubga, São Paulo. *Boim. Inst. oceanogr.*, S. Paulo, 26 (2): 303-338.

TÉCNICAS DE PREPARAÇÃO DE RÉPTEIS E MAMÍFEROS FÓSSEIS

Christina T. G. Gresele^{1,3}
Maria Vitória Y. Müller^{2,3}
Valdor Ochagavía da Costa³

RESUMO

O presente trabalho consiste na descrição de métodos de preparação de répteis e mamíferos fósseis, por nós utilizados nos laboratórios de paleontologia da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul e do Departamento de Paleontologia e Estratigrafia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Nosso principal objetivo é a divulgação destes métodos a novos preparadores de vertebrados fósseis.

ABSTRACT

This paper deals with laboratory methods for preparation of reptilian and mammalian fossils. These methods have been utilized in the paleontological laboratories of the Museu de Ciências (Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul) and Departamento de Paleontologia e Estratigrafia (Universidade Federal do Rio Grande do Sul). Our aim is to divulge these techniques to new technicians of vertebrate paleontology.

-
1. Bolsista pesquisador III C CNPQ
 2. Bolsista de aperfeiçoamento CNPq.
 3. Laboratório de Paleontologia do Museu de Ciências da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.

INTRODUÇÃO

Existem uma multiplicidade de técnicas de preparação de répteis e mamíferos fósseis utilizadas pelos preparadores e pesquisadores brasileiros em diferentes laboratórios de paleontologia, e há a necessidade de um alto grau de improvisação para a obtenção de instrumentais adequados. Neste trabalho, vamos nos ater somente às técnicas atualmente utilizadas nos laboratórios de paleontologia do Museu de Ciências da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul e do Departamento de Paleontologia e Estratigrafia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

MATERIAL E MÉTODOS

O material herpetológico utilizado para ilustrar as técnicas aqui descritas pertence à coleção didática de paleontologia da Fundação Zoobotânica do Rio Grande do Sul (FZB/RS). Este material consta de um crânio, fragmentos de ossos curtos e longos e um occipital identificados como *Scaphonix fischeri* WOODWARD, 1907 e foi coletado por Atilio Munari no jazigo da Alemôa em Santa Maria/RS.

O jazigo da Alemôa é a localidade-tipo do Membro Alemôa da Formação Santa Maria, Triássico, a qual assenta sobre as camadas do Serrinha, topo da Formação Rio do Rastro (Permiano) e apresenta uma fauna rica em répteis fósseis. Paleontólogos e geólogos calculam que após a morte destes répteis, os mesmos ficavam expostos ao sol por um período de tempo relativamente grande até serem recobertos por sedimentos. Esta Formação compõe-se de arenitos vermelhos com estratificação cruzada e intercalações variadas de siltito e argila e apresentando também pequenos seixos de quartzo, incrustações de carbonato de cálcio e conglomerados. A formação (diagenética) de crostas de carbonato de cálcio aderidas aos fósseis é tão expressiva, que torna difícil sua preparação. Este tipo de fossilização (incrustação) com o processo de permineralização e recristalização, ocorre em todos os tetrápodos fósseis da Formação Santa Maria em maior ou menor grandeza.

A preparação de mamíferos será exemplificada com animais de grande porte e de pequeno porte. Os ossos dos mamíferos de grande porte pertencem a um mastodonte, *Haplomastodon waringi* (HOLLAND), procedente da fazenda do Sr. Taltúbio Fialho, em Rosário do Sul, RS. O material fóssil, registrado na coleção de paleovertebrados da FZB/RS sob o número PV-1061 consta de diversos fragmentos de ossos longos, um fêmur quase completo, ossos curtos do carpo e tarso, fragmentos de mandíbula e alguns dentes que foram coletados em camadas sedimentares do Pleistoceno Superior do Rio Grande do Sul.

Os ossos dos mamíferos de pequeno porte são de diversos roedores, ainda não identificados, fossilizados em um arenito grosseiro de camadas sedimentares do Pleistoceno do Acre, doados pelo professor Alceu Ranci (Universidade Federal do Acre) à coleção didática da FZB/RS. Este material consta de porções de dentes

superiores e inferiores, mandíbulas, vértebras e ossos longos e curtos de membros locomotores. A fossilização caracteriza-se como permineralização arenítica com matriz argilosa.

Estas técnicas que passamos a descrever são adequadas aos fósseis com os tipos de fossilização citados e baseiam-se principalmente no equilíbrio entre o ataque químico com ácidos e a preparação mecânica. Este equilíbrio é estabelecido pelo preparador, e depende do seu discernimento e habilidade. Boa parte dessas capacidades, mas não a sua totalidade, são adquiridas através de treinamento e com anos de experiência.

DESCRIÇÃO DAS TÉCNICAS

A. Para répteis fósseis

A técnica a ser adotada depende principalmente da natureza do fóssil e de sua matriz. Basicamente ao abrirmos um bloco de gesso preparado na fase de coleta, o primeiro passo é retirar o sedimento solto com o auxílio de um pincel grande e com muito cuidado para não perder pequenos ossos ou fragmentos de algum osso. Em seguida colam-se as superfícies fraturadas dos ossos utilizando-se Cascopox (super rápido) ou similar, preparado conforme as instruções da embalagem.

Depois de escolher a peça a ser inicialmente trabalhada, procede-se à lavagem em água corrente com uma escova, visando retirar a maior parte do sedimento que está aderido à peça. Permanecendo ainda incrustações (sílica, calcário, quartzo ou óxido de ferro), colocar ácido muriático concentrado sobre a peça com o auxílio de uma bsnaga de plástico. Deixar reagir por alguns minutos e lavar bem em água corrente. Agir assim, sucessivamente, até o aparecimento do tecido ósseo ou esmalte. Caso houver necessidade de se dar continuidade a este processo químico, e o fóssil já estiver parcialmente exposto, devemos proteger a superfície com laca incolor concentrada (Autolack) para evitar a destruição do tecido ósseo pela reação do ácido.

O ácido muriático é altamente tóxico e requer cuidados especiais por parte dos preparadores. É importante que o laboratório seja bem arejado, com janelas abertas e boa circulação de ar para se evitar a auto-aspiração dos vapores, como também é necessário precaver-se do contato direto dos ácidos com os olhos e com a pele. O ideal é o laboratório ter uma "capela" fechada, com exaustor para evitar qualquer inspiração dos gases tóxicos. O preparador deve utilizar também, máscaras apropriadas, com filtros de carvão ativado, ou até máscaras mais sofisticadas com renovação simultânea de oxigênio. Alguns preparadores preferem utilizar neste tipo de preparação uma solução de ácido muriático a 40%, colocando a peça em imersão por algumas horas conforme o grau de agregação do sedimento envolvente. É necessário ter o máximo de cuidado para que o material não se fragmente e caso isso aconteça, deve-se imediatamente colar a fratura óssea para não perder a superfície de contato.

A eliminação da matriz restante é feita por processos mecânicos, com extremo cuidado para não danificar o osso subjacente. Nesta etapa retiram-se as incrustações ainda remanescentes na peça com pequenos cinzéis (talhadeiras) de diferentes tamanhos e um martelo. Durante esta operação torna-se conveniente colocar a peça sobre um saco de areia, para que se tenha uma boa base de sustentação e também para amortecer os golpes de martelo, evitando a ruptura do fóssil.

Conforme o tipo de fossilização pode-se também utilizar brocas rotatórias de alta ou baixa rotação (do tipo odontológico) ou então um lápis elétrico de alta frequência (tipo "vibro-tool"), utilizando-os em locais de difícil acesso, sempre com o cuidado para não fragmentar a peça. Durante esta etapa, pode-se banhar o fóssil com água ou álcool (de secagem mais rápida) com a finalidade de se obter melhor visualização do tecido ósseo que geralmente aparece com tonalidade mais clara que a matriz.

O acabamento da peça, dependendo da fossilização, deve ser feito com lixa d'água ou broca rotatória para dar-lhe uma textura uniforme. Após lavar bem a peça com o auxílio de uma escova ou pincel, deixando-a secar naturalmente ou em estufa. Uma estufa pequena serve para secar rapidamente a área do fóssil onde se está trabalhando, pois temperaturas muito altas podem desagregar o fóssil.

As partes incompletas dos ossos podem ser reconstituídas com gesso de secagem rápida (caso as partes ausentes forem de grandes dimensões) ou Durepoxi (se forem de pequenas dimensões). Para se obter uma tonalidade semelhante a do fóssil deve-se utilizar tinta têmpera (para reconstituições em gesso) ou tinta óleo (para reconstituições em Durepoxi).

Finalmente, reveste-se a peça com uma mistura de laca incolor e Thynner na proporção de 1:1, e termina-se por recobri-la com verniz Coralite ou Colorgin incolor spray. Isto serve para impermeabilizar a peça e facilitar sua limpeza, quando necessário.

B. Para mamíferos fósseis de grande porte

Primeiramente, a limpeza do material deve ser feita com um pincel grosso, se o material for muito friável. Caso contrário, pode-se lavar em água corrente com uma escova e estilete para retirar todo o sedimento aderido.

Para que as peças ósseas, pouco mineralizadas adquiram maior resistência e possibilitem seu manuseio, torna-se necessário infiltrá-las com laca incolor, por exemplo, (Autolack) diluída com Thynner na proporção de 1:1. Aproveitando-se locais fraturados a mistura é aplicada na parte interna e esponjosa do osso com o auxílio de um frasco plástico com válvula (spray). Aguardar alguns segundos para total infiltração da mistura e repetir este processo tantas vezes quanto for necessário, até que não mais ocorra a absorção da laca pelo osso. Externamente, espalhar esta mistura de laca e Thynner com o auxílio de um pincel.

Em determinados casos (ossos longos de grandes dimensões) torna-se necessário a infiltração de Araldite diluído com Clorofórmio ou Thynner na proporção de 1:1, proporcionando maior resistência aos ossos mais frágeis. Também pode-se obter

ótimos resultados com a infiltração de Selador penetrante "Sherwin Williams" em substituição a laca ou Araldite.

A seguir, identifica-se as partes fragmentadas agindo como se fosse a montagem de um "quebra cabeças". Ao encontrar uma parte correspondente a um determinado osso, colar com Cacopox, de preferência o super rápido (5min.) ou Araldite, conforme as dimensões da peça. Para se obter melhor visualização espalhar os fragmentos ósseos sobre uma mesa e procurar orientar-se através da utilização de bibliografia específica.

A reconstrução das partes ausentes é feita ou com gesso ou com Durepoxi, dependendo das dimensões da área a ser reconstruída. Nas partes de grandes dimensões deve-se colocar, no local incompleto, uma boa base de arame ou hastes de ferro com a finalidade de dar maior resistência ao gesso. Este deve ser sempre colocado em excesso sobre as hastes. Depois de seco, esculpir no gesso a forma anatômica do osso com o auxílio de um bisturi, faca, espátula ou até mesmo uma lixa d'água. Se a complementação das partes ausentes for feita com Durepoxi, o procedimento será o mesmo descrito acima. Após colorir as partes reconstruídas, misturando-se vários tons de tinta têmpera Gouache ou similar (no gesso) e tinta à óleo (no Durepoxi) procurando sempre se obter uma tonalidade semelhante ao osso a ser reconstruído.

É aconselhável que o preparador se oriente através do uso de bibliografia específica para o conhecimento de outras técnicas de preparação bem como da anatomia comparada de vertebrados. Sugerimos CAMP & HANNA (1937), COOPER & WHITTINGTON (1964), HOTTON (1964) e STUCKER et al. (1964) para as técnicas e PIVETEAU (1964) para a anatomia comparada.

Finalmente deve-se impermeabilizar a peça preparada, com verniz Coralite ou Colorgin incolor spray para evitar a deposição de poeira, facilitando sua limpeza e conservação.

C. Mamíferos fósseis de pequeno porte

Ao iniciar esta técnica deve-se primeiramente fazer um exame minucioso do sedimento em que estão inseridos os ossos, que neste caso pertencem a pequenos mamíferos roedores. Este detalhe do exame deve ser feito com o auxílio de uma lupa e um aumento de até 4 vezes.

Com a utilização de finas agulhas, previamente fabricadas (de costura acopladas a um cabo de sonda) deve-se retirar os sedimentos da matriz que envolve os ossos. Durante este processo pingar gotas de álcool (de secagem mais rápida) ou água para facilitar a retirada da matriz. Para evitar a fragmentação do material e a possível perda das superfícies de contato, colocar no osso laca incolor (Autolack) diluída com Thynner na proporção de 1:1. Caso necessitar, utilizar cola Duco, Cascopox ou Araldite neste processo.

Por vezes faz-se necessário, dependendo da tenacidade da matriz, a utilização de "Vidro-tool" (aparelho mecânico cuja agulha apresenta alta frequência) na separação dos ossos com extremo cuidado. Em seguida, com o auxílio de pincéis, limpar

bem as peças retiradas da matriz e revestir com laca ou verniz incolor Coralite ou Colorgin Spray para proteção e impermeabilização das peças.

Após, através do uso de bibliografia específica (vide bibliografia sugerida no item anterior), fazer a identificação das partes correspondentes dos ossos.

Em todos os procedimentos anteriores, tais como: uso de adesivos ou de qualquer produto químico tóxico ou não, deve-se utilizar sempre luvas de borracha fina (cirúrgicas) para evitar o contato direto com a pele e máscaras adequadas para este fim.

MATERIAL NECESSÁRIO PARA A ORGANIZAÇÃO DE UM LABORATÓRIO DE PALEONTOLOGIA.

Material permanente

- Agulha histológica.
- Alicate.
- Arco de serra e folhas de serra para armações de ferro.
- Baldes plásticos de diversos tamanhos.
- Bisnagas plásticas com bico reto e curvo.
- Bisturi e lâminas para trabalhar o gesso.
- Brocas rotatórias de baixa rotação (1.000 rotações por minuto) (dentista).
- Brocas de ferro 3/16 a 3/8 (duas de cada).
- Cabo de sonda (dentista) para acoplar agulhas finas de costura.
- Capela fechada.
- Chave de fenda.
- Esmeril elétrico para fazer ferramentas.
- Espátulas para trabalhar com gesso.
- Estufas comuns.
- Exaustor.
- Funil.
- Furadeira elétrica para montagem de armações.
- Grosa para madeira.
- Limas triangulares de ferro.
- Lupa Pala para o preparo de fósseis.
- Lupas manuais.
- Martelos pequenos e grandes.
- Máscaras contra pó e com filtros de carvão ativado.
- Motor de dentista com brocas de chicote flexível e punho de caneta (11.000 rotações por minuto).
- Óculos de proteção.
- Pedra de amolar para afiar talhadeiras e cinzéis.
- Retífica Bosch (50.000 rotações por minuto).

- Sacos de areia para apoiar os fósseis na preparação.
- Talhadeiras de diversos tamanhos (cinzéis).
- Tanque de cimento com duas torneiras.
- Torno de Banca nº 3.
- Ventiladores.
- Vidro-tool ou equivalente (com broca de aço rápido) para limpeza dos fósseis.

Material de consumo

- Ácidos: Acético (Glacial) e Muriático (Clorídrico).
- Acrílico para caixas de exposição de 4 mm (ou vidro).
- Álcool.
- Araldite lento e rápido para grandes colagens.
- Arames de aço para fazer talhadeiras e suportes para o gesso.
- Aventais.
- Cascopox (5min.) para colagens.
- Clorofórmio.
- Durepoxi para reconstituições pequenas.
- Escovas de diversos tamanhos.
- Frascos plásticos (spray ou aerosol).
- Gesso rápido.
- Isa-Raz.
- Lixa d'água.
- Laca (Autolack) para infiltrações.
- Laca nitrocelulose incolor Duco para infiltrações.
- Latex diluído para moldes.
- Lixa de ferro para lixar armações.
- Luvas de borracha finas, cirúrgicas.
- Parafusos com fenda para madeira.
- Parafusos 5/16 e 1/2 rosca grossa com porcas e arruelas.
- Parafusos 3/16 fenda e rosca grossa com porcas e arruelas.
- Pincéis pequenos, médios e grandes.
- Pena para nankin.
- Sabonete de glicerina.
- Selador penetrante "Sherwin Williams" ou similar.
- Selante ou Silastic (borracha siliconada para moldes).
- Tinta esmalte sintética branca.
- Tinta nankin.
- Tinta Têmpera ou Gouache e tinta óleo em várias cores.
- Thynner.
- Verniz incolor Coralite ou Colorgin spray.

AGRADECIMENTOS

Aos Profs. Jeter Jorge Bertoletti (MCPUCRS) e Mário Costa Barberena (UFRGS) pela utilização dos Laboratórios de Paleontologia. Aos paleontólogos Jorge Ferigolo (FZB/RS) e Martha Richter (MCPUC) pelas sugestões e leitura crítica do trabalho. A Fundação Zoobotânica e ao CNPq pelo Projeto de Curadoria de Museus e o apoio financeiro respectivamente através das bolsas de Aperfeiçoamento (Maria Vitória Y. Müller) e de Pesquisador III-C (Christina T.G. Gresele).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- CAMP, C.L. & HANNA, G.D. 1937. **Methods in Paleontology**. Cambridge University Press. London, England.
- COOPER, G.A. & WHITTINGTON, H.B. 1964. Use of Acids in Preparation of Fossils. In: **Handbook of Paleontological Techniques**. (ed. Kummel, B. & Raup, D.) 294-300.
- HOTTON, N. 1964. Tetrapods. In: **Handbook of Paleontological Techniques**. (ed. Kummel, B. & Raup, D.) 119-125.
- PIVETEAU, J. 1964. **Traité de Paléontologie-Vértebrés-Agnathes**. Tomo IV, 1:54-77. França.
- STUCKER, G.F., GALUSHA, M.J. & MCKENNA, M.C. 1964. Removing Matrix from Fossils by Miniature Sandblasting. In: **Handbook of Paleontological Techniques**. (ed. Kummel, B. & Raup, D.) 273-275.

**ESTRUTURA POPULACIONAL E FECUNDIDADE
DE *Pachygrapsus gracilis* (SAUSSURE, 1858)
NO MOLHE DO RIO TRAMANDAÍ, RIO GRANDE DO SUL,
BRASIL (CRUSTACEA, DECAPODA, GRAPSIDAE)**

Getúlio Dornelles Souza¹
Nelson Ferreira Fontoura¹

RESUMO

Através de coletas manuais realizadas durante os meses de junho/92 a maio/93, no molhe do rio Tramandaí, município de Imbé, Rio Grande do Sul, analisou-se a estrutura populacional e a fecundidade de *Pachygrapsus gracilis* (Saussure, 1858). A análise da distribuição de freqüências da largura do cefalotórax permitiu a identificação de três grupos etários para machos e fêmeas. Observou-se igualmente que os machos apresentam maior crescimento assim como maior mortalidade. A proporção sexual do primeiro grupo etário é 1:1, alterando-se favoravelmente para fêmeas nos grupos etários dois e três. As relações peso/largura para machos e fêmeas, comprimento/largura e fecundidade/largura estão determinadas pelas expressões a seguir (largura e comprimento do cefalotórax em cm, peso em gramas): $We = 0,3081 \cdot Wi^{3,1259}$ (machos); $We = 0,2771 \cdot Wi^{3,0879}$ (fêmeas); $L = 0,7555 \cdot Wi^{0,9596}$; $NO = 4194,95 \cdot Wi^{2,2966}$. Onde: We é o peso; Wi é a largura do cefalotórax; L é o comprimento do cefalotórax; NO é o número de ovos carregados por uma fêmea com largura Wi .

ABSTRACT

The age structure, weight/width relationship and fecundity of *Pachygrapsus gracilis* (Saussure, 1858) was studied on the Tramandaí mole, Imbé, Rio Grande do Sul, Brazil, by means of manual samples from June/92 to May/93. Through the analysis of width-frequency distributions, it was identified the presence of three age-groups for males and females. The sex-

1. Instituto de Biociências. Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul. Av. Ipiranga 6681, Caixa Postal 1429, 90619-900 – Porto Alegre – RS – Brasil.
Financiamento CNPq Processo 401459/92-6

ratio of the first age-group was 1:1. For the second and third age-groups *Pachygrapsus gracilis* shows greater male mortality and growth. The weight/width relationship for males and females, length/width and fecundity/width relationships were adjusted by the followings equations (carapace width and length in centimeters, weight in grams): $We = 0,3081 \cdot Wi^{3,1259}$ (males); $We = 0,2771 \cdot Wi^{3,0879}$ (females); $L = 0,7555 \cdot Wi^{0,9596}$; $NO = 4194,95 \cdot Wi^{2,2966}$. Onde: We is the weight; Wi is the carapace width; L is the carapace length; NO is the number of eggs reared by a female with width Wi .

INTRODUÇÃO

Pachygrapsus gracilis (Saussure, 1858) caracteriza-se como um caranguejo grapsídeo de pequeno porte, onde o comprimento máximo da carapaça na linha mediana atinge cerca de 15mm (Chace & Hobbs, 1969). A espécie ocorre em ambos os lados do Oceano Atlântico; na margem oriental, do Senegal até Angola, e na costa ocidental, do sul da Flórida até o Brasil (do Ceará ao Rio de Janeiro), incluindo Bermudas, Bahamas e Antilhas (Holthuis, 1959; Chace & Hobbs, 1969; Powers, 1977). Segundo Rodrigues & Brossi-Garcia (1989), *Pachygrapsus gracilis* apresenta-se distribuído no Brasil até o Estado do Paraná. Entretanto os mesmos autores registraram que, provavelmente, a espécie ocorra no Estado de Santa Catarina, limite sul da presença de manguezais no hemisfério meridional.

Pachygrapsus gracilis é encontrado usualmente entre raízes de mangues e na margem de rios próximos ao mar (Chace & Hobbs, 1969; Powers, 1977). Pode ser visualizado em estacarias, cais e áreas rochosas acima do nível do mar (Powers, 1977). No Suriname, a espécie foi capturada na praia em pedaços de madeira, em buracos de argila dura e em substrato lodoso (Holthuis, 1959). No Brasil, espécimes foram coletados em substratos rochosos e arenolodosos (Rodrigues & Brossi-Garcia, 1989).

O presente trabalho tem por objetivo analisar a estrutura populacional, as relações peso/largura, comprimento/largura e fecundidade/largura da carapaça de *Pachygrapsus gracilis*, apresentando ainda dados adicionais relativos à proporção sexual e reprodução.

MATERIAL E MÉTODO

A análise da estrutura etária, das relações peso/largura, comprimento/largura e fecundidade/largura da carapaça de *Pachygrapsus gracilis* foi realizada a partir de coletas manuais, de junho de 1992 a maio de 1993, ao longo do molhe do rio Tramandaí, Imbé, Rio Grande do Sul. Os espécimes foram capturados entre rochas ou sob as mesmas. Adotou-se como medida padrão a largura máxima do cefalotórax. Os animais foram medidos com um paquímetro com precisão de 0,1mm e posteriormente devolvidos ao seu habitat. Foram conduzidos 181 exemplares (94 machos e 87

fêmeas) ao laboratório de Carcinologia do Instituto de Biociências da PUC e pesados em balança com precisão de 0,001g. A relação entre o comprimento e a largura foi estabelecida através de 146 espécimes de ambos os sexos coletados nos meses de março, abril e maio. Para a determinação da fecundidade, foi estimado o número de ovos de 19 fêmeas. Os ovos de cada fêmea foram separados manualmente, sendo contada uma subamostra de 1000 ovos. A subamostra foi então colocada em um tubo de vidro com diâmetro uniforme, sendo medida, com paquímetro, a altura da coluna de ovos após a decantação. Posteriormente, foram colocados os ovos restantes no mesmo tubo, estimando-se então, o número total de ovos.

Para estimar a largura média do cefalotórax de cada grupo etário, assim como o desvio padrão e a proporção de captura para machos e fêmeas, foi empregado o método de análise da distribuição de frequências através do software MIX (McDonald & Pitcher, 1979).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Embora Rodrigues & Bossi-Garcia (1989) tenham apresentado como limite da distribuição meridional de *Pachygrapsus gracilis* o Estado do Paraná, com possível extensão ao Estado de Santa Catarina, limite sul da ocorrência de manguezais (*Rhizophora mangle*), o presente trabalho amplia a distribuição da espécie para o Rio Grande do Sul, no molhe do Rio Tramandaí, com possibilidade de ocorrência no molhe de Rio Grande.

No início do programa de amostragens, em junho/92, o molhe apresentava basicamente dois tipos de substratos. Nas proximidades do mar, era constituído de rochas basálticas irregulares, e no sentido contrário, a montante, era arenoloso intercalado com trechos rochosos. Além disso, em toda a sua extensão eram encontrados restos de construções, lixos domésticos e sobras de pescaria, formando um complexo rico em ambientes que serviam de habitat para diversas espécies. A partir de julho, a zona rochosa próxima ao mar foi concretada quase que totalmente, tornando-se um bloco único de cimento. Houve, conseqüentemente, grande prejuízo para a fauna e flora local. Dos 503 animais inicialmente capturados e devolvidos ao ambiente em junho, observou-se uma redução para 386 em julho, 119 em agosto, 11 em setembro, 3 em outubro e nenhum em novembro. Amostragens posteriores revelaram o reaparecimento de *Pachygrapsus gracilis*, sugerindo uma recolonização do ambiente. O número de animais coletados por unidade de esforço, entretanto, não chegou a atingir os valores alcançados antes do concretamento. Tal fato pode ser explicado pela diminuição de nichos disponíveis para abrigo e alimentação, expondo os animais ao ataque de predadores.

Ao analisar-se o gráfico de distribuição de frequências da largura do cefalotórax (Figura 1), observa-se que machos e fêmeas de *Pachygrapsus gracilis* apresentam três grupos etários bem definidos. As estimativas da largura média do cefalotórax por

grupo etário, do desvio padrão e proporção de captura para machos e fêmeas, analisados através do software MIX (McDonald & Pitcher, 1979), podem ser visualizadas através das tabelas 1 e 2. O primeiro grupo etário apresenta uma proporção sexual próxima de 1:1. Nos demais grupos etários, entretanto, observa-se uma quantidade maior de fêmeas em relação aos machos. Tal fato pode ser devido a dois fatores: maior taxa de mortalidade em machos ou menor dificuldade na captura de fêmeas devido a fatores comportamentais. A hipótese de mortalidade diferencial, entretanto, é corroborada por Abele et al. (1986). Segundo estes autores, os machos adultos de *Pachygrapsus transversus* defendem seus abrigos e protegem áreas próximas de outros machos menores. Em oposição, as fêmeas não defendem áreas, podendo ser observadas movendo-se livremente em territórios defendidos por machos, embora prefiram permanecer em seus próprios territórios por vários dias. A agressividade no comportamento territorial dos machos pode explicar uma maior mortalidade por dois fatores principais. Em primeiro lugar, a necessidade de freqüentes disputas territoriais faz com que os animais se exponham aos inimigos naturais, em especial peixes e aves. Por outro lado, machos de menor porte ficam sujeitos a locais menos adequados quanto à disponibilidade de alimento e refúgios. Os valores absolutos das taxas de mortalidade, entretanto, não podem ser calculados devido a

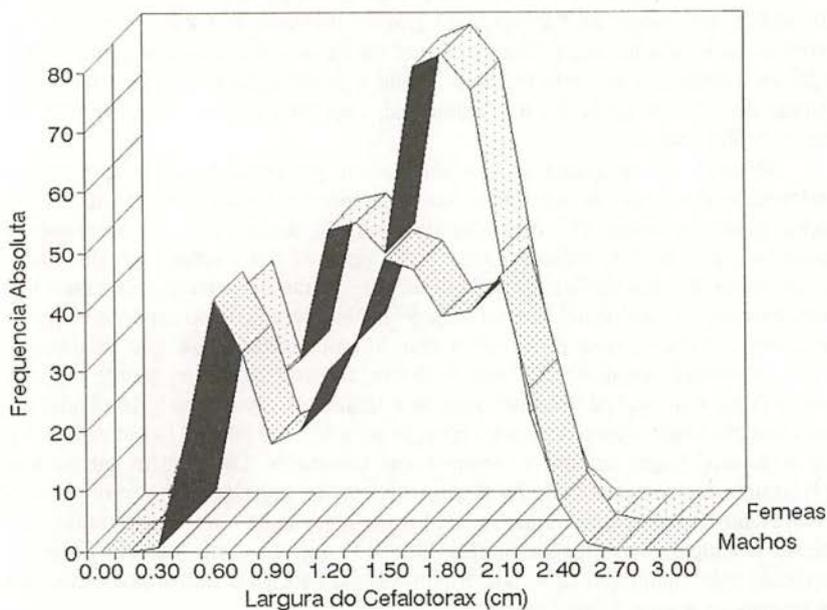


Fig. 1: Distribuição de freqüências de machos e fêmeas de *Pachygrapsus gracilis* no molhe do rio Tramandaí, município de Imbé, capturados nos meses de junho, julho e agosto de 1992.

uma forte seletividade de captura, uma vez que organismos de maior porte têm maior probabilidade de serem vistos e capturados em coleta manual. De qualquer forma, a presença de três grupos etários para machos e fêmeas sugere uma longevidade de até 3 anos para a espécie. O comportamento territorial de machos é corroborado ainda pelo maior porte destes em relação às fêmeas em todos os grupos etários (Tabelas 1 e 2).

Tabela 1: Largura média do cefalotórax, desvio padrão e proporção de captura por grupo etário de machos de *Pachygrapsus gracilis* no molhe do rio Tramandaí, município de Imbé, capturados nos meses de junho, julho e agosto de 1992.

Grupo etário	Largura Cefalotórax	Desvio Padrão	Proporção de Captura
I	0,57	0,12	0,21
II	1,46	0,35	0,61
III	2,04	0,14	0,18

Tabela 2: Largura média do cefalotórax, desvio padrão e proporção de captura por grupo etário de fêmeas de *Pachygrapsus gracilis* no molhe do rio Tramandaí, município de Imbé, capturados nos meses de junho, julho e agosto de 1992.

Grupo etário	Largura Cefalotórax	Desvio Padrão	Proporção de Captura
I	0,50	0,10	0,14
II	1,01	0,18	0,26
III	1,60	0,23	0,60

As relações entre o peso e a largura calculadas para machos ($n=94$; $r=0,997$) e fêmeas ($n=87$; $r=0,993$) são descritas pelas equações a seguir (largura do cefalotórax em cm e o peso em gramas) Figuras 2 e 3. (Ver p. 34)

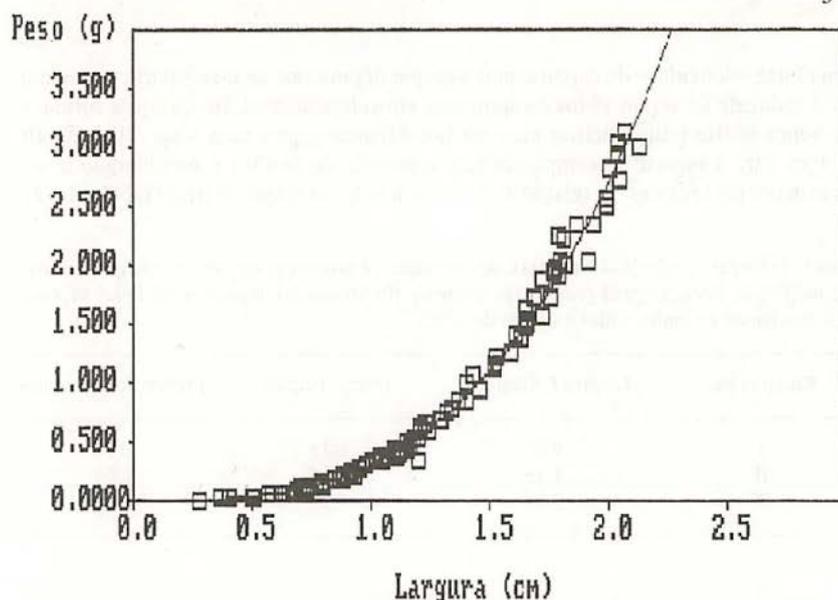


Fig. 2: Relação peso/largura do cefalotórax para machos de *Pachygrapsus gracilis* no molhe do rio Tramandaí, município de Imbé, capturados nos meses de fevereiro, março e abril de 1993.

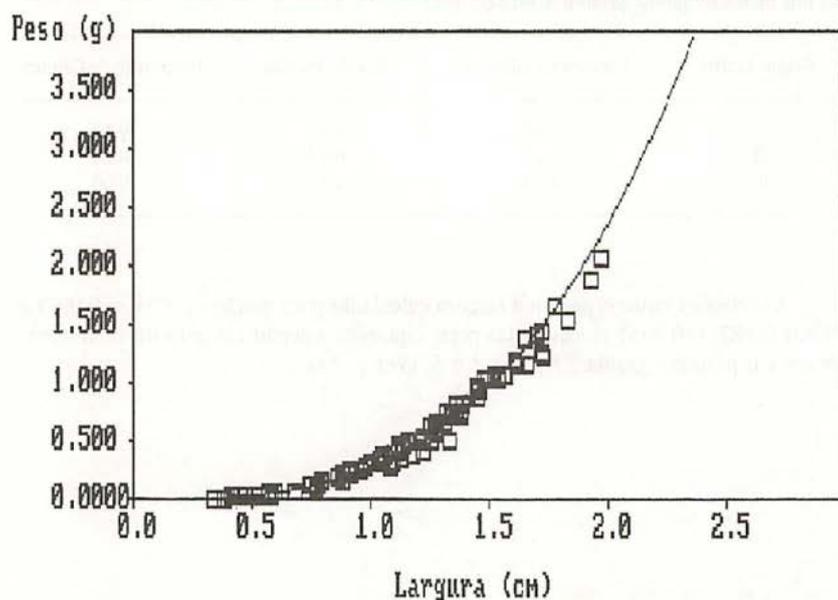


Fig. 3: Relação peso/largura do cefalotórax para fêmeas de *Pachygrapsus gracilis* no molhe do rio Tramandaí, município de Imbé, capturados nos meses de fevereiro, março e abril de 1993.

$We = 0,3081. Wi^{3,1259}$ (machos)

$We = 0,2771. Wi^{3,0879}$ (fêmeas)

Onde:

We é o peso;

Wi é a largura do cefalotórax.

A relação entre o comprimento e a largura da carapaça ($n=146$; $r=0,9963$) é descrita pela seguinte equação (comprimento e largura do cefalotórax em cm) (Figura 4):

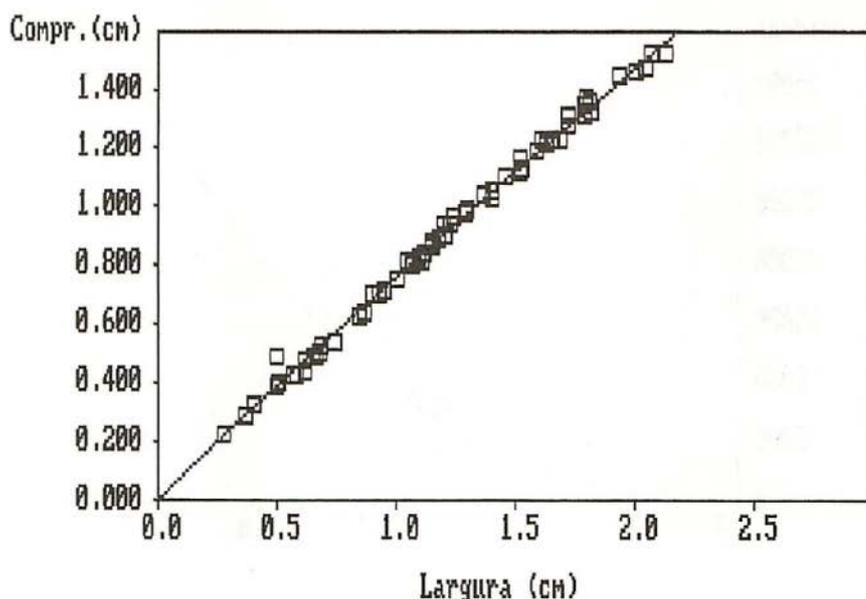


Fig. 4: Relação comprimento/largura do cefalotórax de *Pachygrapsus gracilis* no molhe do rio Tramandaí, município de Imbé, capturados nos meses de fevereiro, março e abril de 1993.

$L = 0,7337. Wi^{0,9833}$

Onde:

Wi é a largura do cefalotórax;

L é o comprimento do cefalotórax.

O período reprodutivo de *Pachygrapsus gracilis* não se encontra completamente esclarecido, embora existam evidências de que para o Rio Grande do Sul a reprodução se estenda da primavera ao outono, com maior intensidade no verão. No mês de junho de 1992 foi capturada uma única fêmea ovada portando poucos ovos. As demais fêmeas ovígeras foram coletadas entre janeiro e maio de 1993, variando entre 0,92 e 1,90cm na medida da largura da carapaça. Na contagem dos ovos, foram utilizadas fêmeas capturadas em fevereiro devido à ocorrência de um pico de desova. Os animais analisados apresentaram larguras do cefalotórax entre 0,92 e 1,73cm. A relação entre a fecundidade e a largura foi ajustada pela seguinte expressão ($n=19$; $r=0,7783$; largura do cefalotórax em cm) (Figura 5):

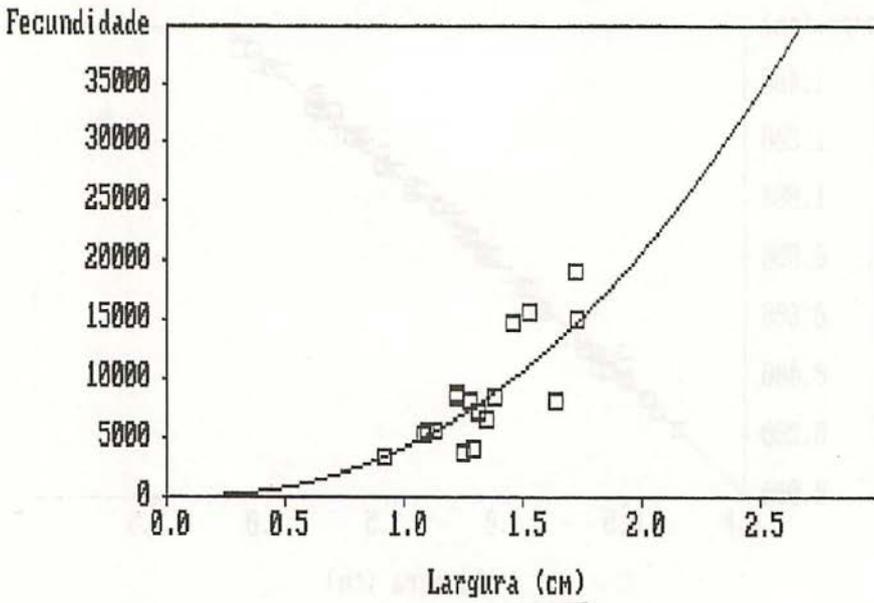


Fig. 5: Relação fecundidade/largura do cefalotórax de *Pachygrapsus gracilis* no molhe do rio Tramandaí, município de Imbé, capturados no mês de fevereiro de 1993.

$$NO = 4194,95 W_i^{2,2966}$$

Onde:

W_i é a largura do cefalotórax;

NO é o número de ovos carregados por uma fêmea com largura W_i .

Ogawa & Rocha (1976), determinando a fecundidade absoluta de alguns crustáceos decápodos marinhos do estado do Ceará, estimaram a fecundidade de *Pachygrapsus gracilis* em 4756 ovos, em fêmeas com comprimento total da carapaça entre 5,5 e 11,8mm, valores inferiores ao obtido em média no presente trabalho. Rodrigues & Brossi-Garcia (1989), constataram fêmeas portando ovos, com 0,92 a 1,5cm de medida antero-posterior da carapaça, correspondendo a larguras de 1,3 a 2,07cm. Já Holthuis (1959), observou fêmeas ovígeras de *Pachygrapsus gracilis* com larguras a partir de 0,7 cm. Comparando-se os dados de Holthuis (1959) com a distribuição de freqüências aqui obtida para os meses de junho, julho e agosto, observa-se que o valor de 0,7cm corresponde ao tamanho limite entre o primeiro e segundo grupo etário (Figura 1), sugerindo que a primeira maturação em fêmeas ocorra com a idade aproximada de 1 ano.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABELE, L.G., CAMPANELLA, P.J., SALMON, M. 1986. Natural history and social organization of the semiterrestrial grapsid crab *Pachygrapsus transversus* (Gibbes). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, Amsterdam, 104:153-170.
- CHACE Jr., F.A. & HOBBS Jr., H.H. 1969. The freshwater and terrestrial decapod crustaceans of the west Indies with special reference to Dominica. *U. S. National Museum Bulletin*, Washington, 292:258p.
- HOLTHUIS, L.B. 1959. Crustacea Decapoda of Suriname (Dutch Guiana). *Zoologische Verhandelingen*, Leiden, 44:296p.
- OGAWA, E.F. & ROCHA, C.A.S. 1976. Sobre a fecundidade de crustáceos decápodos marinhos do Estado do Ceará, Brasil. *Arquivos Ciências do Mar*, Fortaleza, 16(2):101-104.
- MACDONALD, P.D.M. & PITCHER, T.J. 1979. Age-groups from size-frequency data: A versatile and efficient method of analyzing distribution mixtures. *J. Fish. Res. Board Can.*, Ottawa, 36:987-1001.
- POWERS, L.W. 1977. A catalogue and bibliography to the crabs (Brachyura), of the Gulf of Mexico. *Contributions in Marine Science*, Port Aransas, 2:140-2. Suplemento.
- RODRIGUES, M.D. & BROSSI-GARCIA, A.L. 1989. Notas sobre novas ocorrências de *Pachygrapsus gracilis* (Saussure, 1858) (Crustacea, Brachyura, Grapsidae) no litoral brasileiro. *Ciência e Cultura*, 41(1):63-66.
- WILLIAMS, A.B. 1984. *Shrimps, lobsters and crabs of the Atlantic Coast of the Eastern United States, Maine to Florida*. Washington, Smithsonian Institution, 550p.

REALOCAÇÃO GENÉRICA DE *Xenodon weneri* EISELT, 1963 (SERPENTES: COLUBRIDAE)

Vanda Lúcia Ferreira Yuki¹

RESUMO

O estudo dos caracteres hemipenianos de *Xenodon weneri* Eiselt, 1963 permite retirar a espécie do gênero *Xenodon* Boie, 1827. *X. weneri* retornaria à espécie original, *Procteria viridis* Werner, 1924, se o gênero *Procteria* Werner, 1924 não estivesse pré-ocupado por *Procteria* Davis, 1885 para um Coelenterata. Propõe-se o gênero *Thalesius* **nom. nov.**, com subfamília e tribo **incertae sedis**.

ABSTRACT

The hemipenian morphology of *Xenodon weneri* Eiselt, 1963 allows to remove this species from the genus *Xenodon*, Boie, 1827. The species *X. weneri* would return to *Procteria viridis* Werner, 1924 if the genus *Procteria* Werner, 1924 wasn't preoccupied by *Procteria* Davis, 1885 (for a Coelenterata). The genus *Thalesius* **nom. nov.** is proposed, with the subfamily and tribe **incertae sedis**.

1. Bolsista da CAPES, Linha de Pesquisa em Herpetologia, Instituto de Biociências, PUCRS. Av. Ipiranga, 6681, C.P. 1429, CEP 90619-900, Porto Alegre, RS, Brasil.

INTRODUÇÃO

A tribo Xenodontini é constituída pelos gêneros *Xenodon* Boie, 1827, *Liophis* Wagler, 1830 (*sensu* Dixon, 1980), *Erythrolamprus* Wagler, 1830, *Lystrophis* Cope, 1885, *Umbrivaga* Roze, 1964, e *Waglerophis* Romano *et* Hoge, 1972, sendo definida por apresentar hemipênis bilobado e espinhoso terminando em um disco (Dowling & Duellman, 1978; Jenner, 1981).

Xenodon possui atualmente seis espécies: *X. severus* Linnaeus, 1758, *X. rabdocephalus* (Wied, 1824), *X. bertholdi* Jan, 1863, *X. neuwiedii* Günther, 1863, *X. guentheri* Boulenger, 1894 e *X. weneri* Eiselt, 1963. A última espécie foi descrita originalmente como *Procteria viridis* por Werner (1924) e realocada em *Xenodon* com o nome *X. weneri* por Eiselt (1963), visto que *X. viridis* estava pré-ocupado por *X. viridis* Duméril, Bibron *et* Duméril, 1854, sinônimo de *Macropisthodon plumbicolor* Cantor, 1839.

Peters & Orejas-Miranda (1970) não incluíram *X. weneri* em sua chave de identificação, afirmando que esta espécie parece ser muito similar a *X. suspectus* Cope, 1868, não comentando em que aspecto. Dixon (1983) sinonimizou *X. suspectus* com *X. rabdocephalus*.

Dowling & Duellman (1978) alocaram *Procteria* Werner, 1924 em Lycodontinae, tribo Lycophidini, com dúvida.

Hoogmoed (1985) redescreveu *X. weneri* apresentando um cuidadoso histórico, onde a variação da espécie é baseada em material novo, estabelecendo a sua distribuição geográfica.

Através de um estudo minucioso da morfologia do hemipênis das espécies de Xenodontini, verificou-se a necessidade de retirar *X. weneri* do gênero *Xenodon*.

MATERIAL E MÉTODOS

As siglas das instituições seguem Leviton *et al.* (1985).

Foi retirado o hemipênis direito do exemplar RMNH 13535 e o crânio do RMNH 247 (fêmea), sendo o hemipênis preparado de acordo com a técnica de Pesantes (no prelo) e mantido em álcool 70°GL. Devido à raridade da espécie nas coleções as comparações de peças anatómicas foram limitadas.

Utilizou-se Dowling & Savage (1960) para caracterizar e descrever o hemipênis.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os exemplares examinados apresentam coloração dorsal esverdeada com as escamas dorsais contornadas de marrom a preto e com pequenos pontos pretos distribuídos por toda a escama. As escamas paraventrals são mais claras que as

dorsais, aproximando-se do creme. O ventre é amarelado a creme, podendo haver pequenos pontos escuros. A cabeça dorsalmente é esverdeada, maculada de preto (Fig. 1); lateralmente é amarela a creme, com pequenas manchas pretas e com uma estria entrecortada de mesma cor, que segue da região média do post-ocular superior até a região posterior da abertura da boca (Fig. 2).

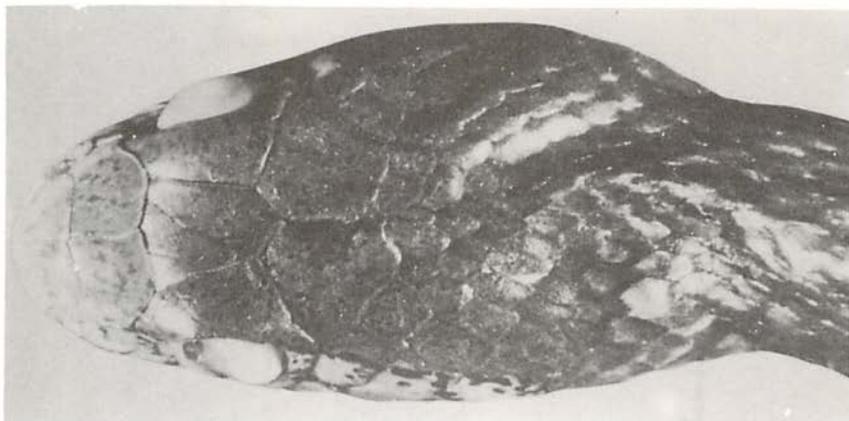


Fig. 1: Vista dorsal da cabeça de *Thalesius viridis* (Werner, 1924) (RMNH 247, fêmea).

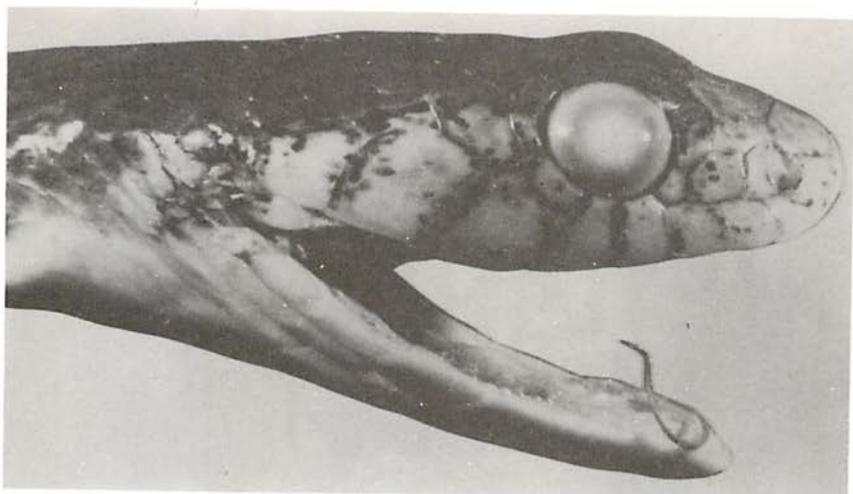


Fig. 2: Vista lateral da cabeça de *Thalesius viridis* (Werner, 1924) (RMNH 247, fêmea).

O hemipênis do exemplar RMNH 13535 alcança a 15ª subcaudal quando invertido. É bilobado quanto a forma geral, sendo que os ramos perfazem 43,04% do comprimento do órgão (Fig. 3). O sulco espermático bifurca-se a partir de 47,23% do corpo do hemipênis, seguindo até o ápice, sendo do tipo centrifugal (conforme McDowell, 1961) (Fig. 4).

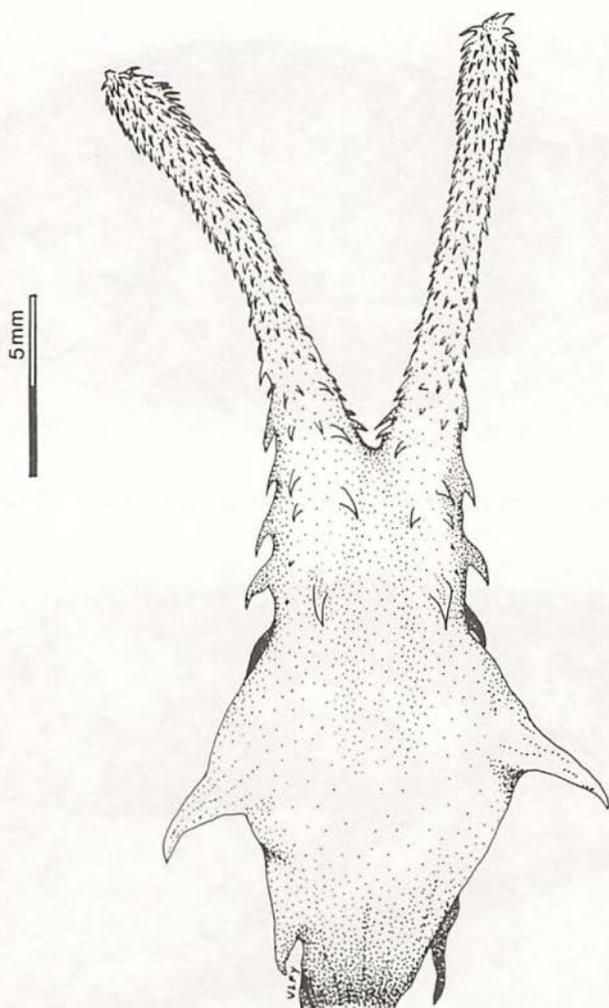


Fig. 3: Vista dorsal do hemipênis de *Thalesius viridis* (Werner, 1924) (RMNH 13535).

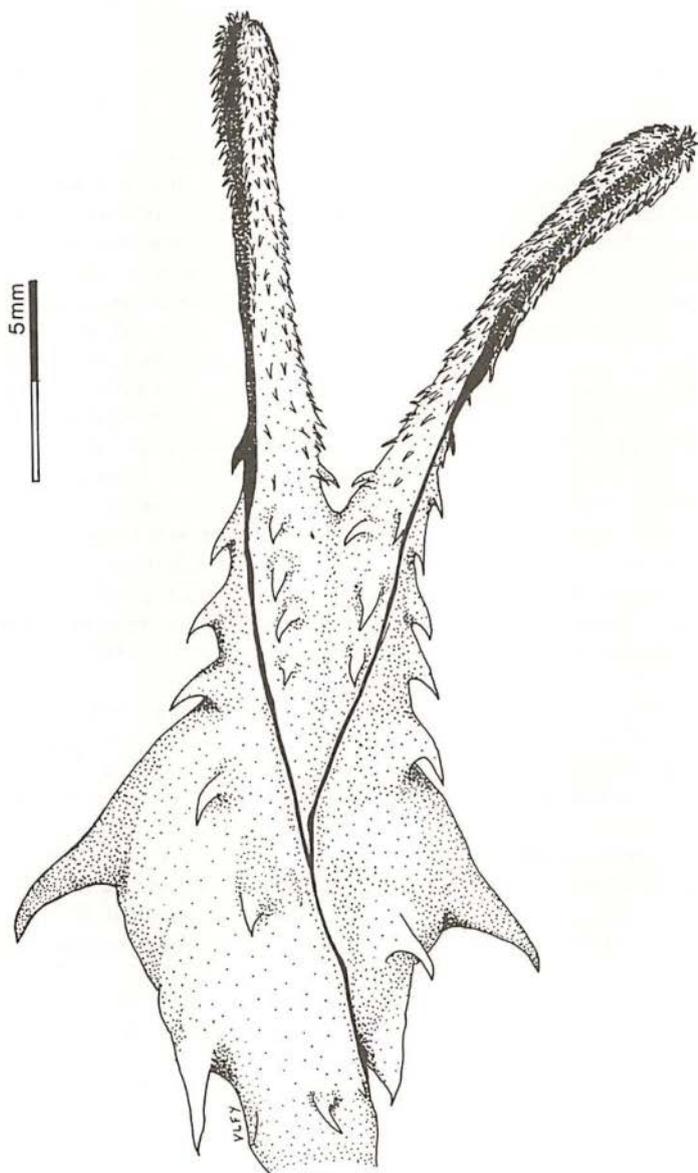


Fig. 4: Vista ventral do hemipênis de *Thalesius viridis* (Werner, 1924) (RMNH 13535).

Comun. Mus. Ciênc. PUCRS. Porto Alegre, nº 53, p. 39-47, novembro, 1993

Quanto à ornamentação, o órgão apresenta espinhos distribuídos no corpo e ramos. O pedúnculo é nú apresentando algumas pregas transversais e longitudinais. Os ramos são cobertos por espinhos pequenos na região dorsal, lateral, ventral e apical, desde a bifurcação do órgão até o ápice, exceto no sulco espermático (Fig. 3 e 4).

A distribuição dos espinhos no corpo do órgão apresenta-se da seguinte forma: região dorsal (Fig. 3) – apresenta dois espinhos bastante conspícuos, denominados ganchos basais, estando um de cada lado, inseridos na metade do comprimento do corpo, com cerca de 9,83% do comprimento do hemipênis. A região basal apresenta pregas longitudinais que vão desde o pedúnculo até a metade do corpo. Na região mediana encontra-se uma leve depressão longitudinal, iniciando-se entre os ganchos basais e indo até a bifurcação do órgão. Após os ganchos basais, na região dorsolateral, verifica-se a presença de três espinhos em cada lado que regridem de tamanho à medida que se distanciam da base e se aproximam da região bifurcada, que é coberta por espinhos pequenos. Região ventral (Fig. 4) – na porção basal observa-se um pequeno espinho mediano e, mais lateralmente, encontra-se um espinho de tamanho médio em cada lado, sendo o direito maior. Antes da bifurcação do sulco espermático, verifica-se uma fila de seis espinhos de cada lado, sendo que o primeiro espinho do lado esquerdo é maior que os subsequentes, os quais decrescem em tamanho à medida que se aproximam dos ramos. Estas filas percorrem o corpo deslocando-se lateralmente até a região lateral dos ramos. Entre os sulcos, após a bifurcação, observa-se uma fila de espinhos de cada lado, que vão até a região basal dos ramos. Entre o terceiro espinho de cada lado, antes da bifurcação do órgão, encontra-se um espinho mediano. Alguns espinhos bem pequenos ocorrem entre essas duas últimas filas de espinhos.

A morfologia do hemipênis constatada corrobora os dados hemipenianos obtidos por Gasc & Rodrigues (1980) e Hoogmoed (1985). Os autores observaram que o órgão atinge a 14ª subcaudal mas não fizeram referência ao ápice do mesmo.

As classificações mais recentes a nível de tribo são baseadas principalmente na morfologia do hemipênis (Dowling & Duellman, 1978; Jenner, 1981), sendo a tribo Xenodontini definida por apresentar hemipênis com ápice discado. Verificando a morfologia hemipeniana da espécie em questão, nota-se a presença de espinhos no ápice do órgão, discordando do principal caráter da tribo Xenodontini.

Xenodon werner não pode retornar ao gênero e espécie original, *Procteria* Werner, 1924, pois de acordo com Williams & Wallach (1989) este já está pré-ocupado por *Procteria* Davis, 1885 para Coelenterata. Assim, propõe-se um novo nome a nível genérico, em homenagem ao Prof. Dr. Thales de Lema.

Thalesius nom. nov.

Thalesius viridis (Werner, 1924), nov. comb.

Procteria viridis Werner, 1924: 48. Localidade-tipo. Tsumeb, Sudeste da África (esta localidade-tipo foi contestada por Bogert (1940), Mertens (1955), Eiselt (1963)

- e Mertens (1971), sendo considerada duvidosa) Holótipo fêmea, NMW 17119. Dowling & Duellman, 1978: 112b.2.
- Xenodon werneri* Eiselt, 1963: 280; Mertens, 1971: 7; Gasc & Rodrigues, 1980: 588; Hoogmoed, 1983: 236, 253; Böhme & Bischoff, 1984: 163; Peters & Orejas-Miranda, 1970: 323; Hoogmoed, 1985: 79.

Distribuição geográfica:

- Suriname: Marowijine District, Nassau Mountains: RMNH 13535, macho; Nickerie District, Luci Camp: RMNH 13536, macho.
- Guiana Francesa: MNHN 8395, macho. Maratony River: LACM 44500, fêmea, Maripoulou: ZMFK 38267, macho.
- Sem procedência: RMNH 247, fêmea.

Diagnose: Vide Hoogmoed (1985: 81).

A dentição maxilar do exemplar RMNH 247 é constituída por 12 + 2 dentes, que aumentam gradativamente de tamanho no sentido antero-posterior, sendo os pós-diaستمais bem maiores que os últimos pré-diaستمais e destituídos de sulco. Hoogmoed (1985) apresenta exemplares com dentição variando de 12 a 14 + 2 dentes.

Dowling & Duellman (1978) provavelmente desconheciam o trabalho de Eiselt (1963) e alocaram *Procteria* Werner, 1924 em Lycodontinae, tribo Lycophidini, com dúvida ocasionada, possivelmente, pela ausência de caracteres da espécie. No entanto, os caracteres maxilares apresentados pelos autores para a subfamília Lycodontinae não coincidem com aqueles observados em *Thalesius viridis*.

Os caracteres do maxilar e do hemipênis de *T. viridis*, comparados com aqueles propostos por Dowling & Duellman (1978), estão mais próximos daqueles apresentados pelos membros da subfamília Natricinae, apesar do sulco espermático ser centrifugal, sendo necessário um estudo envolvendo outros caracteres para alocar a espécie a nível de subfamília e tribo.

CONCLUSÃO

Xenodon werneri Eiselt, 1963 é retirado do gênero *Xenodon* Boie, 1827 por apresentar hemipênis bilobado, espinhoso, com ganchos basais bastante conspícuos e ápice com espinhos.

É proposto novo nome genérico, *Thalesius* *nom. nov.*, para *Procteria* Werner, 1924 visto que este está pré-ocupado por *Procteria* Davis, 1885.

A subfamília e tribo de *Thalesius viridis* (Werner, 1924) permanecem *incertae sedis*, necessitando de estudos mais aprofundados.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos ao Dr. Marinus S. Hoogmoed, curador do Rijksmuseum van Natuurlijke Historie (RMNH), Leiden, Holanda, pelo empréstimo do material e permissão para a preparação das peças anatômicas. Ao Prof. Lauro J. Jantsch pelo auxílio nas traduções, ao Prof. Albérico N. de Queiroz e Prof. Rubens Nobuo Yuki pela colaboração e leitura dos originais, Prof. Marcos Di-Bernardo pelas fotos e, ao Dr. Thales de Lema pelo apoio e orientação.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BÖHME, W. & BISCHOFF, W. 1984. Die Wirbeltiersammlungen des Museums Alexander Koenig. III. Amphibien und Reptilien. *Bonn. Zool. Mon.* 19: 151-213.
- BOGERT, C. M. 1940. Herpetological results of the Vernay Angola Expedition. *Bull. Amer. Mus. Nat. Hist.* (77): 1-107.
- DIXON, J. R. 1980. The neotropical colubrid snake genus *Liophis*. The generic concept. *Milwaukee Public Museum Contrib. Biol. Geol.* (31): 1-41.
- DIXON, J. R. 1983. Taxonomic status of the brazilian colubrid snake, *Xenodon suspectus*, Cope. *Texas J. Sc.* 35: 257-260.
- DOWLING, H. G. & DUELLMAN, W. E. 1978. *Systematic Herpetology: A synopsis of families higher categories*, New York, Hiss Publ., 7: 240p.
- DOWLING, H. G. & SAVAGE, J. M. 1960. A guide to the snake hemipenis: a survey of basic structure and systematic characteristics. *Zoologica.* 45(2): 17-33.
- EISELT, J. 1963. Zur kenntnis der colubriden schlangengattungen *Procteria* und *Xenodon*. *Ann. Naturhistor. Mus. Wien.* 66: 279-282.
- GASC, J. P. & RODRIGUES, M. T. 1980. Liste préliminaire des serpents de la Guyane française. *Bull. Mus. natn. Hist. Paris* (4) 2 (a): 559-598.
- HOOGMOED, M. S. [1982] 1983. Snakes of the Guianan region. *Mem. Inst. Butantan.* (46): 219-254.
- HOOGMOED, M. S. 1985. *Xenodon werneri* Eiselt, a poorly known snake from Guiana, with notes on *Waglerophis merremii* (Wagler) (Reptilia: Serpentes: Colubridae). Notes on the Herpetofauna of Suriname IX. *Zoologische Med. Leiden.* 59(8): 79-88.
- JENNER, J. 1981. A zoogeographic study and the taxonomy of the Xenodontinae colubrid snakes. *Diss. Ph.D., N. Y. University.* 356pp.
- LEVITON, A. E. GIBBS, R. H.-JR, HEAL, E. & DAWSON, C. E. 1985. Standards in Herpetology and Ichthyology: Part I. Standard symbolic codes for institutional resource collections in herpetology and ichthyology. *Copeia.* (3):802-832.
- McDOWELL, Jr S. B. 1961. [Review of] Systematic division and evolution of the colubrid snake genus *Natrix*, with comments on the subfamily Natricinae, by Edmond V. Malnate. *Copeia.* 1961(4): 502-506.
- MERTENS, R. 1955. Die Amphibien und Reptilien Südwestafrikas. Aus den Ergebnissen einer im Jahre 1952 ausgeführten Reise. *Abh. senckenb. naturf. Ges.* 490: 1-172.
- MERTENS, R. 1971. Die Herpetofauna Südwest-Afrikas. *Abh. senckenb. naturforsch. Ges.* 529: 1-110.
- PESANTES, O. S. (no prelo). A method for preparing hemipenis of preserved snakes. *J. Herpetolol. Comun. Mus. Ciênc. PUCRS. Porto Alegre*, nº 53, p. 39-47, novembro, 1993

- PETERS, J. A. & OREJAS-MIRANDA, B. 1970. Part 1. Snakes: 1-347 *in* Peters, J. A.; Danoso-Barros, R. & Orejas-Miranda, B. Catalogue of the neotropical squamata. U. S. Nat. Mus. Bull. (297): i-viii, 1-347, i-viii, 1-293.
- WERNER, F. 1924. Neue oder wenig bekannte Schlangen aus dem Naturhistorischen Staatsmuseum in Wien. Stiz. Ber. Ak. Wiss. Wien. (1) 133: 29-56.
- WILLIAMS, K. L. & WALLACH, V. 1989. *Snakes of the World*. 2^a ed. Malabar, Krieger Publishing Company. v. 1. 232pp.

CONTRIBUIÇÃO AO CONHECIMENTO DA PISCICULTURA
DO PEIXE-REI *Odonthestes bonariensis*
(VALENCIENNES, 1835) — NOVAS INFORMAÇÕES
E EXPERIMENTOS LABORATORIAIS

Jeter Jorge Bertoletti^{1,3}
Rose Maria Borges Fortes Widholzer³
Isabel Cristina Junqueira³
Valkiria Montardo Munçone^{2,3}

RESUMO

São fornecidas novas informações sobre o histórico da piscicultura do peixe-rei *Odonthestes bonariensis* (Valenciennes, 1835) e experimentos de incubação de ovos utilizando-se bastidores em aquários diversos com água bruta ou tratada com ou sem anti-cloro e anti-fungo, além da utilização de incubadoras usuais com água tratada corrente e testes de arraçoamento artificial de larvas. Tais experimentos resultaram na possibilidade de incubação de ovos em água tratada e água bruta, ambas não renováveis, desde que filtradas e oxigenadas. As larvas alimentam-se de ração artificial.

ABSTRACT

New information about the history of fish culture of *Odonthestes bonariensis* (Valenciennes, 1835) is given. Hatching experiments were made in tanks with unrenovable water, using either untreated river water or treated water, with or without anti-chlorine and anti-fungal substances. Hatching occurred in both, treated and untreated waters, which have been filtered and oxygenated. The larvae fed on artificial fish food.

1. Bolsista Pesquisador do CNPq.
2. Mestranda do Pós-Graduação do Instituto de Biociências da PUCRS.
3. Laboratório de Aquacultura do Museu de Ciências da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Av. Ipiranga, 6681, Cx. Postal 1249, CEP 90619-900, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil.

INTRODUÇÃO

Foram constatados registros de atividades em piscicultura desde 2.000 a.C., no Egito, com criações de tilápias em piscinas de nobres, sendo que o livro mais antigo deste ramo data de 500 a.C. (Menezes & Yancey, 1983).

De norte a sul do Brasil, muitas pesquisas vêm sendo realizadas com o objetivo de desenvolver técnicas próprias, adequando-se às diversas condições ambientais do local (Menezes & Yancey, 1983). No estado do Rio Grande do Sul, as condições para a Aquacultura são excepcionais devido ao grande potencial hídrico da região (Bertoletti, 1981).

Rodolpho Von Ihering, desde 1930, começou a interessar-se pela prática da piscicultura através da tentativa de introdução de espécimes de peixe-rei, *Odonthestes bonariensis*, nas cabeceiras do rio Tietê e represas de São Paulo, Brasil. Na ocasião, os primeiros ovos embrionados vieram da Argentina e, apesar de eclodirem a bordo do navio, morreram antes de chegar ao porto de Santos, no estado de São Paulo (Azevedo, 1935).

Em 1934, Azevedo levou ovos e alevinos de peixe-rei, provenientes da Estação de Piscicultura de Chascomus – Argentina, para São Paulo e Rio de Janeiro, porém a tentativa também falhou, possivelmente devido a quedas bruscas de temperatura (Nomura, 1976).

Atualmente, a ocorrência do gênero *Odonthestes*, família ATHERINIDAE, é registrada desde a costa de Santos, São Paulo, até a Argentina (Regalado e Mastrarrigo, 1954; Ringuet, 1942; De Buen, 1953; Ringuet et al., 1967; Huet, 1973). No Rio Grande do Sul, Kleerekoper (1945) comenta que, em 1941, foram encontradas espécies nativas na Lagoa dos Quadros e na Lagoa Itapeva, situadas nos atuais municípios de Terra de Areia e Torres. Além disso, Paiva e Scheffer (1982) registram sua ocorrência no rio Jacuí, e Bertoletti (1986) em praticamente todo o Estado.

Em julho de 1941, Elinor Fortes capturou reprodutores de *Odonthestes bonariensis* no rio Guaíba, caracterizado geograficamente como lago Guaíba, em Ponta Grossa, Porto Alegre, e realizou a fecundação com sucesso, iniciando, assim, a primeira produção de alevinos no Estado. Com a orientação de técnicos da Estação Experimental de Caça e Pesca de Pirassununga, São Paulo, do Ministério da Agricultura, Fortes, como Bióloga da Divisão de Caça e Pesca de Porto Alegre, a partir de 1942 organizou o Laboratório de incubação e criação de larvas e alevinos de peixe-rei junto a um açude em Ponta Grossa, área daquela Divisão do Ministério da Agricultura. Os primeiros ovos foram incubados em aquários com água corrente do lago Guaíba e, posteriormente, em incubadoras de vidro cilíndricas padrões, semelhantes às apresentadas neste experimento. As larvas eram colocadas em aquários e, a seguir, em tanques de alvenaria e no açude, ainda hoje existente (Comunicação verbal de Fortes, 1993, ao autor sênior).

Em 1943, segundo Kleerekoper (1945), pela primeira vez foi dado início à distribuição de ovos embrionados produzidos no Posto Limnológico e de Piscicultura de peixe-rei na Lagoa dos Quadros, no então município de Osório, RS, hoje, Terra de Areia.

O Posto de Piscicultura foi construído a partir de um estudo feito por Kleerekoper, a pedido do Serviço de Informação Agrícola do Ministério da Agricultura, onde o mesmo iniciou suas atividades. Posteriormente, Kleerekoper, como Limnologista da Divisão de Caça e Pesca, assumiu a direção do referido Posto, em 1943.

Bertoletti et al., em 1972, por solicitação do Grupo Executivo da Indústria da Pesca do Rio Grande do Sul (GEDIP), fez um relatório das condições em que se encontrava o Posto de Piscicultura da Lagoa dos Quadros e, em 1977, elaborou o projeto Lagoa dos Quadros, visando basicamente a reestruturação e reativação do Posto, com o objetivo de dar continuidade às atividades iniciadas por Kleerekoper e propiciar a imediata produção e distribuição de alevinos de *Odonthestes bonariensis*.

Durante a recuperação dos tanques de criação, construção de edificações, montagem dos laboratórios e organização das diversas instalações e equipamentos, foi propiciada a captura, fecundação e produção de alevinos de peixe-rei. Mesmo sem as condições ideais para a piscicultura, em 1978, foram capturados 6.584 machos e 2.417 fêmeas, produzindo 908.100 ovos, dos quais 148.600 atingiram o estágio de alevinos, sendo distribuídos em açudes diversos, e 20.000 colocados na Lagoa dos Quadros, de onde foram capturadas as matrizes. Paralelamente, produziu-se alevinos de outras espécies de peixes (Bertoletti, 1979).

No Rio Grande do Sul também ocorrem criações de outras espécies de peixes como tilápias, carpas, jundiás, carás, trutas, black-bass, clarias, etc., entretanto, o interesse pelo peixe-rei, mesmo não sendo o mais cultivado, ainda tem a preferência por ter sido sua criação muito divulgada por 50 anos e apresentar carne de fino paladar e com boa cotação no mercado. Porém, no RS a prática de criação nem sempre é satisfatória, concorrendo, para isso, problemas estruturais e de ordem técnico-financeira, especialmente.

Na natureza, na época de fecundação e incubação dos ovos, ocorrem as perdas naturais, inclusive de alevinos, pois o ataque de predadores é contínuo e intenso. Aliado a isso, a poluição hídrica e a pesca predatória de espécimes em reprodução contribuem fundamentalmente para a diminuição dos estoques. Em face ao exposto, o peixe-rei já não ocorre na mesma quantidade como em anos atrás, quer no lago Guaíba, na lagoa dos Quadros, no rio Uruguai ou em outros pesqueiros conhecidos, especialmente em lagos e açudes do litoral norte e da planície central do RS.

O peixe-rei, com sua agilidade, protege-se de vários inimigos, mas na fase prematura são pouco hábeis. São muitos os predadores de *O. bonariensis*, dos quais destacamos preferencialmente predadores de ovos – garças (*Ardea cocoi*, *Casmerodius albus* e *Egretta thula*) e o colhereiro (*Platalea ajaja*); predadores de ovos, alevinos e jovens – lambaris (*Astyanax* spp., *Charax* sp., *Cheirodon* sp.) e carás (*Cichlasoma* sp., *Geophagus* sp.); predadores de alevinos e jovens – joaninha (*Crenicichla* sp.), traíra (*Hoplias* sp.), dentado (*Oligosarcus* sp.), jundiá (*Rhamdia* sp.), mergulhão caçador (*Podilymbus podiceps*), biguá (*Phalacrocorax olivaceus*) e o martim pescador (*Ceryle torquata*, *Chloroceryle amazona* e *C. americana*) (Comunicação verbal do autor sênior). O canibalismo também contribui para o desaparecimento de alevinos (Azevedo, 1935; Ringuélet 1942; Kleerekoper, 1945; Godói, 1946; Machado, 1973; Nomura, 1976).

Em face ao exposto, e visando, além do treinamento de pessoal, a produção de alevinos para povoar açudes, represas e fazendas aquáticas em nossa região, contribuindo, assim, para incrementar a criação desta espécie, foram realizados no Laboratório de Aquacultura do Museu de Ciências da PUCRS experimentos de incubação de ovos de peixe-rei utilizando-se técnicas e materiais diferenciados em relação aos usuais, ou sejam: incubadoras na forma de bastidores flutuantes com armação de madeira ou plástico com fundo telado, colocados na superfície da água não renovável em aquários diversos e, também, incubadoras de vidro comuns, porém, com água corrente (direta) tratada pelo Departamento Municipal de Água e Esgotos de Porto Alegre (DMAE).

MATERIAL E MÉTODOS

Campo

A captura do peixe-rei, *Odonthestes bonariensis* (Valenciennes) (Fig. 1), foi realizada entre 05 e 06 de setembro de 1992, na Ilha do Junco, Parque Itapuã, lago Guaíba, RS, Brasil (Fig. 2).

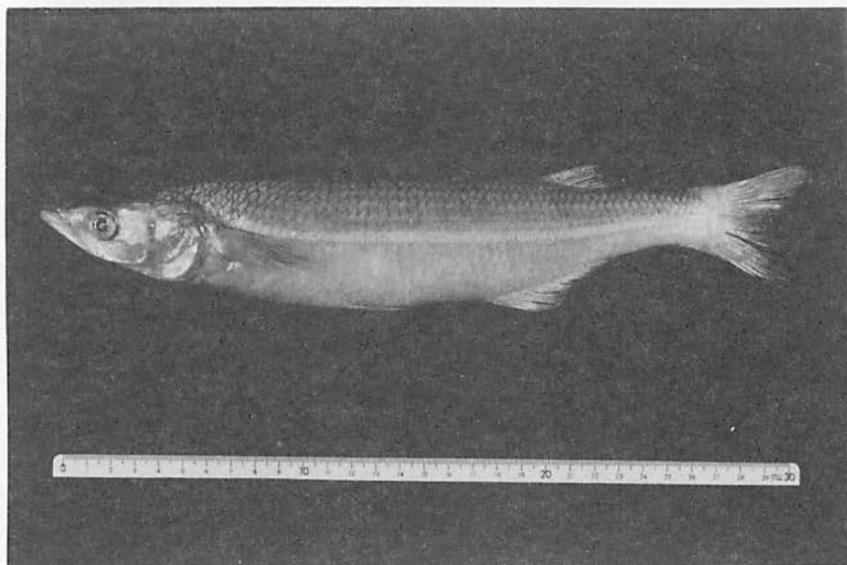


Fig. 1: Exemplar de peixe-rei *Odonthestes bonariensis* (Valenciennes), capturado em setembro de 1992, nas proximidades da Ilha do Junco, Lago Guaíba, Rio Grande do Sul, Brasil.

Utilizou-se embarcação de alumínio (Karib 500) com 5m de comprimento, motor (Evinrude) 14 hp e 12 redes de espera medindo 240m lineares com 360m² e apresentando malhas de 3 e 4cm (entrenós adjacentes).

As redes foram colocadas na água por volta das 18 horas e retiradas ao amanhecer (entre 6 e 7 horas), em locais de solo arenoso e areno-lodoso, próximo a juncais. Coletou-se água do local da captura dos peixes para posterior análise da qualidade física, química e biológica.

Capturou-se 18 exemplares de *O. bonariensis* (3 fêmeas e 15 machos), dos quais 2 fêmeas apresentavam óvulos maduros e 9 machos encontravam-se com esperma, sendo que apenas 3 no ponto para fecundação.

A metodologia utilizada para extrusão dos óvulos e esperma baseou-se nas técnicas de Kleerekoper (1945), Regalado & Mastrarrigo (1954) e Huet (1973).

A massa de óvulos foi colocada sobre uma placa de Petri e, sobre ela, o esperma, sendo logo após homogeneizados com uma pena de galinha previamente esterilizada.

Após 3 minutos, o material obtido foi depositado em um recipiente plástico com um pouco de água do local da coleta dos peixes.

Posteriormente, acrescentou-se mais água do mesmo local da captura, cerca de 3/5 do volume total do recipiente de 2 litros de capacidade, para hidratação dos ovos. Este processo teve duração aproximada de 2 horas, ao abrigo do vento e da luz, e com permanente aeração realizada através de um aerador portátil (Vigoar).

A temperatura da água do recipiente foi medida constantemente e, para mantê-la próxima da temperatura do ambiente, o recipiente foi colocado dentro de uma bandeja inoxidável, com pedras de gelo em sua volta. Tais cuidados foram necessários, devido, também, a grande distância da ilha até a praia, e dessa até o laboratório, num total aproximado de 65 km.

Após a perfeita hidratação dos ovos, esses, em forma de aglomerados, foram colocados sob uma lâmina de água dentro de uma bandeja, onde, com o auxílio de uma tesoura, cortou-se os seus filamentos. Os ovos isolados, resistentes e elásticos, foram mergulhados novamente no recipiente com água renovada do local. Tal recipiente, envolto com gelo dentro de uma caixa de isopor, foi transportado ao laboratório numa viagem com duração de 2 horas.

O processo de aeração, renovação de água e colocação de gelo foi necessário devido a grande diferença da temperatura da água do Guaíba, 14,5°C, em relação à temperatura atmosférica, 24°C.

Laboratório I

Para realizar a incubação dos ovos montou-se cinco aquários retangulares, dois aquários redondos e quatro incubadoras.

Em face à experimentação com água parada (não renovável), e visando a melhor aeração dos ovos em incubação, foram confeccionados bastidores flutuantes de madeira e de plástico para os aquários.

Cada bastidor de madeira media 15x10cm, sendo que no fundo foi fixada uma tela de náilon com malha de 1mm entre pontos ou nós adjacentes. Colocado na superfície da água, ficava mergulhado até a metade de sua espessura, sendo ancorado por cordões e flutuando sobre o ar (microbolhas) emitido através das pedras porosas.

O bastidor de plástico, incolor, possuía forma cilíndrica, com 19cm de altura e 9,7cm de diâmetro, cortado a partir de um recipiente descartável de refrigerante, e fundo com tela de náilon igual a dos bastidores. Na metade deste cilindro foi presa uma chapa de isopor com orifício central, de forma a permitir a flutuação do mesmo. Este bastidor foi fixado no aquário da mesma forma que os bastidores de madeira.

Os modelos de bastidores empregados (madeira e plástico) diferenciam-se em estrutura com o objetivo de facilitar a fabricação com menor custo.

Utilizou-se água bruta do Guaíba, do local da captura dos peixes (AB) e água tratada pelo DMAE (AT), não renovável e corrente. Em alguns aquários que continham água tratada colocou-se anti-cloro comercial Atlantys a fim de eliminar o cloro residual.

O verde de malaquita (Riedel-Hannover) foi empregado para a eliminação de fungos.

Aquários retangulares

Os aquários retangulares eram de volumes variados (Aq1, Aq2, Aq3, Aq4 e Aq5).

Os Aq1, Aq2, Aq3 e Aq4 foram confeccionados com vidro de 4mm de espessura, colados com silicone. O Aq5 possuía armação e fundo de aço inoxidável. Todos os Aq continham filtros biológicos com armação tabular plástica e lâ de vidro, sobre a qual colocou-se areia grossa e média. Para a aeração utilizou-se mangueiras plásticas, borbulhadores de pedras porosas e um compressor de ar SCHULTZ de 120 atm, com filtro (Dovel).

Os bastidores de madeira foram colocados em cada um dos aquários, com exceção do Aq5 que recebeu o bastidor de plástico.

Nos Aq1, Aq3 e Aq5 foi utilizado o anti-cloro comercial Atlantys, diluído na forma de gotas até atingir o ND de cloro residual.

No Aq4 a água tratada ficou em repouso por três dias e o cloro residual não foi detectado.

O verde de malaquita (Riedel-Hannover) preparado em solução 1g/200 l foi colocado no Aq2 e Aq5, durante os primeiros três dias alternados.

Nos Aq1 e Aq4 foram distribuídos vegetais ornamentais pertencentes às seguintes espécies:

Urticaria sp., *U. minor*, *U. vulgaris*, *Sagittaria montevidensis*, *Myriophyllum brasiliensis*, *M. proserpinacoides* e *Mayaca sellowiana* (Botelho, 1977; Botelho, 1982 e Hoeng, 1979).

Portanto, os Aq com filtros biológicos e aerizadores ficaram assim constituídos:

- Aq1 – 54l de AT com anti-cloro, bastidor de madeira e vegetais ornamentais;
- Aq2 – 44l de AB, bastidor de madeira e verde de malaquita;
- Aq3 – 44l de AT com anti-cloro e bastidor de madeira;
- Aq4 – 54l de AT, bastidor de madeira e vegetais ornamentais;
- Aq5 – 198l de AT com anti-cloro, bastidor de plástico e verde de malaquita.

Aquários redondos

Utilizou-se dois aquários redondos (AI e AII) de 7 litros, nos quais colocou-se, em cada um deles, 5 litros de AB, filtros, carvão ativado, fibra de vidro e aeração. No AII foi colocado um bastidor de madeira e verde de malaquita com a mesma metodologia utilizada nos Aq2 e Aq5.

Incubadoras

Apresentando a forma de vaso ou jarra, as quatro incubadoras de vidro (IA, IB, IC, ID) (Fig. 3), medindo 33cm de altura por 13,5cm de diâmetro e base côncava, recebiam água através de um tubo de vidro distante cerca de 2cm do fundo, por meio de um sistema de abastecimento de água tratada pelo DMAE, na quantidade média de 2 litros por minuto. A água oxigenou e movimentou os ovos lentamente, saindo pela parte superior diretamente ou através de sifões de vidro.

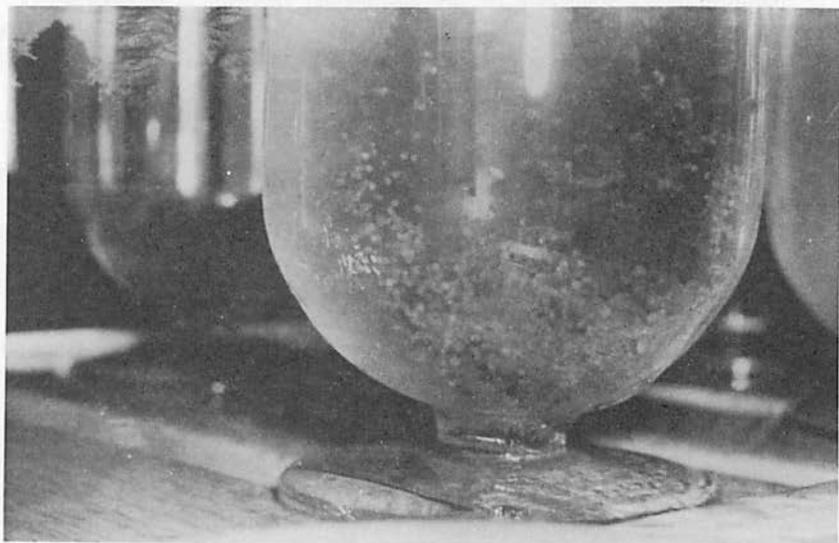


Fig. 3: Incubadora cônica com sistema de água tratada corrente, onde foram colocados os ovos para o desenvolvimento embrionário.

O verde de malaquita foi preparado em solução 1g/200 litros em uma garrafa com regulador, a qual lançava na IA uma gota a cada 20 segundos durante 1 hora por dia.

Laboratório II

Na lupa, muitos ovos foram liberados de restos de filamentos ainda presentes, separados com uma pipeta de ponta grossa e colocados em 11 sacos plásticos contendo AB, de acordo com a técnica de Bertolotti (1977) para troca de ambientes aquáticos.

Entretanto, devido a morosidade desta tarefa, em face ao sistema de treinamento não efetuou-se a total separação dos ovos fecundados de eventuais gorados.

Um total de 2.250 ovos foram distribuídos após 10 minutos de ambientação nos aquários e incubadoras, da seguinte forma: Aq1-410, Aq2-100, Aq3-200, Aq4-80, Aq5-50 e AI1-80 (colocados dentro dos bastidores); AI-180 e IA, IB, IC, ID-1.150 (colocados no fundo).

A distribuição foi realizada de maneira aleatória, sendo que na IA colocou-se um maior número de ovos.

Durante o período de desenvolvimento dos ovos verificou-se a temperatura das águas duas vezes por dia, às 10h e às 15h. Com as médias destas medidas foram calculadas as unidades térmicas acumuladas (U.T.A.). A média do primeiro dia constitui a primeira U.T.A.; as médias dos dias subsequentes são somadas à U.T.A. anterior, obtendo-se, assim, a U.T.A. de cada dia de acordo com Godoy, 1946.

Verificou-se também diariamente o pH das águas; a incidência de fungos (*Saprolegnia*) nos ovos (os quais eram eliminados quando apresentavam hifas) e o sistema de aeração, além da vistoria e manutenção de todo o aparato montado no laboratório.

A qualidade da AB, AT do local do desenvolvimento dos ovos e AT direta foi analisada no Laboratório do Centro de Saneamento Básico do DMAE, estabelecendo-se os parâmetros conforme Tabela 3.

Sendo o ambiente pobre em plâncton específico para a alimentação, e não tendo-se como objetivo produzir cultura de microorganismos ou outra ração natural, utilizou-se uma ração na forma de farinha em pó. Esta foi produzida com matéria prima básica, constituída de farinha de peixe, farinha de trigo, farinha de milho e um complexo de dezesseis vitaminas e aglutinantes. Os teores da ração, garantidos por análise da Empresa Socil, totalizaram aproximadamente 40% de proteínas, 12% de sais, 7% de umidade e baixos índices de gorduras e fibras. Os hidratos de carbono, em maior parte, e vitaminas, completam a fórmula básica.

RESULTADOS E COMENTÁRIOS

Na tabela 1 estão registradas as temperaturas médias diárias de cada incubadora e aquário até a desativação de cada um deles, e também o período (nº de dias e horas acumuladas) do desenvolvimento das atividades.

A tabela 2 mostra as U.T.A.s dos Aq4, Aq5 e AII, cujos ovos apresentaram desenvolvimento completo até a eclosão, com formação de larvas.

O período de observações e atividades de laboratório foi de dezesseis dias, conforme o registro a seguir:

- Aq1 - 6 dias (144h) - Observou-se desenvolvimento normal dos ovos.
 - 8 dias (192h) - Apresentavam fungos em grande quantidade.
 - 9 dias (216h) - Desenvolvimento embrionário interrompido. Excesso de fungos. O aquário foi desativado.
- Aq2 - 3 dias (72h) - Ovos em estágio avançado de desenvolvimento, mas atacados por fungos. Utilizou-se o verde de malaquita.
 - 6 dias (144h) - Desenvolvimento embrionário interrompido. Apresentavam fungos em grande quantidade. O aquário foi desativado.
- Aq3 - 3 dias (72h) - 1 ovo em desenvolvimento embrionário. Os demais apresentavam fungos.
 - 9 dias (216h) - Desenvolvimento embrionário interrompido. Excesso de fungos. O aquário foi desativado.
- Aq4 - 3 dias (72h), U.T.A. 58,8°C - Vários ovos em desenvolvimento embrionário (blástula).
 - 4 dias (96h), U.T.A. 73,3°C - Desenvolvimento embrionário progressivo, embora muitos ovos apresentassem fungos.
 - 5 dias (120h), U.T.A. 88,3°C - Ovos em desenvolvimento embrionário.
 - 6 dias (144h), U.T.A. 104,3°C - Embriões apresentando olhos nítidos e batimentos cardíacos.
 - 10 dias (240h), U.T.A. 169,3°C - Ovos com fungos em excesso.
 - (248h) - 6 ovos eclodiram.
 - 11 dias (264h), U.T.A. 187,3°C - 5 ovos eclodiram.
 - 12 dias (288h), U.T.A. 205,3°C - As larvas nadavam pelo aquário. (11 + 9 larvas do Aq5).
 - 16 dias (384h), U.T.A. 273,5°C - As larvas se desenvolviam satisfatoriamente com ração artificial.

Apesar da constatação de fungos, o Aq4 encontrava-se estabilizado, com água límpida e larvas nadando com rapidez a procura do alimento em forma de pó, ministrado sobre a superfície líquida.

- Aq5 - 3 dias (72h), U.T.A. 56,9°C - Alguns ovos em desenvolvimento embrionário (Blástula).
- 4 dias (96h), U.T.A. 70,9°C - Vários ovos em desenvolvimento embrionário.
- 5 dias (120h), U.T.A. 86,4°C - Embriões com olhos formados mas sem pigmentos, circulação sanguínea e meláforos.
- 8 dias (192h), U.T.A. 134,4°C - Vários embriões continuavam em pleno desenvolvimento.
- 10 dias (240h) U.T.A. 167,4°C - Embriões apresentando olhos bem formados e movimentando a cabeça e as mandíbulas.
- 12 dias (288h), U.T.A. 203,8°C - 9 ovos eclodiram. Neste dia as 9 larvas e alguns ovos foram transferidos para o Aq4 e o aquário foi desativado devido ao excesso de fungos.
- AI - 3 dias (72h) - Ovos em desenvolvimento embrionário interrompido entre 30 e 48h. Excesso de fungos. Presume-se, também, pela posição das pedras porosas e produção de microbolhas, pouca oxigenação na água de fundo.
- AII - 3 dias (72h) U.T.A. 58°C - Ovos em desenvolvimento embrionário (Blástula).
- 6 dias (144h), U.T.A. 102,5°C - 5 embriões encontravam-se no bastidor, sendo que 3 foram eliminados por conterem fungos.
- 11 dias (264h), U.T.A. 186,9°C - Vários ovos eclodiram.
- 12 dias (288h), U.T.A. 205,3°C - 17 larvas nadavam no aquário.

Este aquário, com 5 litros de AB, ovos em bastidor, oxigenados e com verde de malaquita, apesar da presença dos fungos apresentou 21,2% de eclosões, o maior índice entre os experimentos. As larvas também foram transferidas para o Aq4, aquário que apresentava as melhores condições ambientais.

Acredita-se que também houve falhas na fecundação, provavelmente, pela imaturidade de óvulos, especialmente.

Em síntese, observou-se que no Aq4, com 54 l de AT sem anti-cloro, eclodiram 11 larvas; no Aq5, com 198 l de AT com anti-cloro e verde de malaquita, eclodiram 9 larvas, e no AII, com 5 l de AB e verde de malaquita, eclodiram 17 larvas, totalizando apenas 37 larvas, motivo pelo qual os experimentos deverão ser repetidos a fim de serem detectadas as origens dos fatores negativos.

Incubadoras

3 dias (72h) – Os ovos apresentavam-se com as mesmas divisões celulares do primeiro dia e muitos haviam gorado. Não constatou-se fungos, entretanto, para uma perfeita comprovação da interrupção do desenvolvimento embrionário, o sistema continuou em observação.

5 dias (120h) – O estágio do desenvolvimento dos ovos encontrava-se nas mesmas condições do primeiro dia.

9 dias (216h) – Todas as incubadoras foram desativadas.

Observou-se que todos os ovos das incubadoras tiveram seu desenvolvimento paralizado no momento em que receberam AT direta, e não constatou-se a presença de quaisquer fungos.

Além do cloro residual há outros parâmetros com valores não adequados para a piscicultura do peixe-rei, como o OD e pH, principalmente.

CONCLUSÕES

- O histórico sobre a piscicultura do Peixe-rei é enriquecido com o trabalho de Fortes em Porto Alegre, RS.
- Na água tratada, em repouso por três dias (Aq4), naquela onde utilizou-se anti-cloro (Aq5), e na água bruta (AII), através da técnica utilizada, os ovos de peixe-rei desenvolveram-se, originando larvas sadias.
- Nas incubadoras, a multiplicação celular dos ovos foi interrompida ao receberem água tratada direta, e não houve surgimento de fungos, comprovando, assim, que a mesma é letal para ambos.
- O verde de malaquita, utilizado internacionalmente no combate a fungos sobre ovos em incubação, na proporção utilizada de 1 g/200 litros durante os três primeiros dias alternados, nos Aq2, Aq5 e AII, não foi eficaz.
- As larvas alimentam-se satisfatoriamente com ração artificial, sendo necessário a continuidade dos experimentos para a reavaliação de seu comportamento e crescimento.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos as seguintes pessoas pela participação no presente trabalho: Adair Ramires, técnico auxiliar na montagem, organização e manutenção dos aquários e atividades de campo realizadas juntamente com Jorge Dionir da Silva; Gizelani M. Guazelli, acadêmica bolsista do CNPq, pelo auxílio em atividades de laboratório; Marli Custódio de Abreu, bióloga Ms, pela contribuição no acompanhamento das experiên-

cias: Carmen Suzana Martins Freitas, bióloga especialista, pela identificação das espécies vegetais, aos doutores Luiz Roberto Malabarba, Carlos Alberto S. de Lucena e Martha Richter pelas sugestões apresentadas e Ana Clair R. Bertoletti, bióloga especialista, pela revisão do presente trabalho.

Tabela 1. Médias do controle diário de temperaturas (C) da água durante o desenvolvimento dos ovos nas incubadoras e aquários.

Data	INCUBADORAS				AQUÁRIOS					Total de dias/horas acumuladas		
	A	B	C	D	I	2	3	4	5	I	II	
6/9	14,0	14,0	14,0	14,0	14,9	14,5	14,5	14,5	14,0	14,0	14,5	0/0
7/9	14,0	14,0	14,0	14,0	14,9	14,5	14,5	14,5	14,0	14,0	14,5	1/24
8/9	14,0	14,0	14,0	14,0	14,9	14,5	14,5	14,9	14,9	14,0	14,5	2/48
9/9	14,0	14,0	14,0	14,0	14,9	14,5	14,5	14,9	14,0	14,0	14,5	3/72
10/9	14,0	14,0	14,0	14,0	14,5	14,0	14,0	14,5	14,0	-	14,0	4/96
11/9	15,0	15,0	15,0	15,0	15,0	15,0	15,0	15,0	15,5	-	15,0	5/120
12/9	16,0	16,0	16,0	15,5	16,0	15,5	15,5	16,0	16,0	-	15,5	6/144
13/9	16,0	16,0	16,0	16,0	16,0	-	16,0	16,0	16,0	-	16,0	7/168
14/9	16,2	16,0	16,2	16,2	16,5	-	16,0	16,0	16,0	-	16,0	8/192
15/9	16,5	16,5	16,5	16,5	17,0	-	16,5	16,5	16,5	-	16,9	9/216
16/9	-	-	-	-	-	-	-	16,5	16,5	-	16,5	10/240
17/9	-	-	-	-	-	-	-	18,0	18,2	-	19,0	11/264
18/9	-	-	-	-	-	-	-	18,0	18,2	-	19,0	12/288
19/9	-	-	-	-	-	-	-	16,4	-	-	-	13/312
20/9	-	-	-	-	-	-	-	16,9	-	-	-	14/336
21/9	-	-	-	-	-	-	-	16,8	-	-	-	15/360
22/9	-	-	-	-	-	-	-	18,1	-	-	-	16/384

Obs.: (-) período em que foram desativados os aquários e incubadoras.

Tabela 2. Medidas de U.T.A.s (Unidades Térmicas Acumuladas), horas e total de dias, de desenvolvimento dos ovos e larvas de peixe-rei, *Odonihestes bonariensis* (Valenciennes) nos Aq4, Aq5 e AH.

Dias	UTAs (Unidade Térmica Acumulada)			Total de horas acumuladas h	Nº de dias Acumulados
	Aquário 4	Aquário 5 C	Aquário II		
6/9	14,5	14,0	14,5	0	0
7/9	29,0	28,0	29,0	24	1
8/9	43,9	42,9	43,5	48	2
9/9	58,8	56,9	58,0	72	3
10/9	73,3	70,9	72,0	96	4
11/9	88,3	86,4	87,0	120	5
12/9	104,3	102,4	102,5	144	6
13/9	120,3	118,4	118,5	168	7
14/9	136,3	134,4	134,5	192	8
15/9	152,8	150,9	151,4	216	9
16/9	169,3*	167,4	167,9	240	10
17/9	187,3*	185,6	186,9*	264	11
18/9	205,3*	203,8*	205,9	288	12
19/9	221,7*	-	-	312	13
20/9	238,6*	-	-	336	14
21/9	255,4*	-	-	360	15
22/9	273,5	-	-	384	16

* Obs. Dias em que ocorreram as eclosões dos ovos nos aquários.

Tabela 3. Parâmetros de qualidade da água do ambiente natural – Água Bruta do Lago Guaíba, local de captura do peixe-rei; do ambiente artificial – Água tratada, local do desenvolvimento das larvas e da água tratada direta da Estação de Tratamento de Água do DMAE.

Parâmetros	Água Bruta	Água Tratada	Água Tratada	Unidades
	(Amb. Natural)	(Amb. Artificial)	(direta corrente) (Amb. Artificial)	
Oxigênio dissolvido (OD)	9,3	8,9	6,6	mg/l O ₂
Demanda Bioquímica de Oxigênio (DBO)	0,6	2,6	–	mg/l O ₂
Cloreto	5,25	17,16	10,03	mg/l Cl
Cloro Residual	–	–	1,50	mg/l Cl
Alcalinidade	1,4	8,0	6,0	mg/l CaO ₃
pH	7,22	7,23	5,9	–
Nitrito	0,01	0,018	ND	mg/l NO ₂
Nitrato	0,54	0,50	2,24	mg/l NO ₃
Fosfato Total	0,20	0,26	0,21	mg/l PO ₄
Condutividade	52,7	99,2	100,0	umho/cm
Sódio	3,04	11,43	5,4	mg/l Na
Potássio	1,57	2,50	2,1	mg/l K
Ferro	0,81	ND	0,24	mg/l Fe
Plâncton	1,01 x 10	5,0 x 10	1,3 x 10	organismos/l

Obs.: ND – Não detectável.

BIBLIOGRAFIA

- AZEVEDO, P. de 1935. Introdução do Peixe-rei no Brasil. *O Campo*. 6(2): 25-30.
- BERTOLETTI, J.J. Peixe-rei. 1977. *Basilichthys bonariensis*. captura, acondicionamento, transporte e colocação de alevinos em novo ambiente. Secretaria de Agricultura, EMMA. Porto Alegre. 12p.
- . 1977. *Projeto Lagoa dos Quadros*. Governo do Estado do Rio Grande do Sul. Secretaria de Agricultura. Museu de Ciências-PUCRS. 30 p. il.
- . 1979. *Projeto Lagoa dos Quadros*. Estação de Piscicultura de Osório. Governo do Estado do Rio Grande do Sul. Secretaria de Agricultura. Museu de Ciências – PUCRS. 4p. il.
- . 1981. Problemas e Soluções de Pesca no Rio Grande do Sul. *Veritas*, Porto Alegre. (103): 356-369.
- . 1986. Principais peixes capturados no Rio Grande do Sul. *Veritas*, Porto Alegre, 31(122): 273-280.
- BOTELHO, G.F. e RANGEL, R.M. 1977. *Seleção de plantas aquáticas*. São Paulo, Nobel, 222p. il.
- . 1982. *Plantas aquáticas para aquário*. São Paulo. Nobel. 78p. il.
- Comun. Mus. Ciênc. PUCRS. Porto Alegre, nº 54. p. 49-64, novembro, 1993

- De BUEN, F. 1953. Los Pejerreys (Fam. Atherinidae) en La Fauna Uruguaya, com discription de nuevas especies. *Boletim Instituto Oceanográfico*, São Paulo, 4(1): 3-80.
- GODÓI, M.P. de 1946. Contribuição à biologia do peixe-rei *Odonthestes bonariensis*. *Rev. Brasil. Biol.*, Rio de Janeiro, 6(3): 373-84.
- HOENG, C.F. 1979. *Plantas Aquáticas*. Secretaria de Agricultura, São Paulo, 168p. il.
- HUET, MARCEL. 1973. *Tratado de Piscicultura*. Versão Espanhola de F. Javier Benito Martinez. Ediciones Mundi-Prensa xxx + 728p, 503 fig. Madrid.
- KLEEREKOPER, H. 1945. *O Peixe-Rei*. Serviço de Informação Agrícola. Ministério da Agricultura. Rio de Janeiro, 98p.
- MACHADO, C.E. de M. 1973. *Criação Prática de Peixes*. Nobel: São Paulo, 5:89-94. 1973.
- MENEZES, J. R. R. de & YANCEY, D. R. 1983. *Manual de Criação de Peixes*. Campinas: Instituto Campineiro de Ensino Agrícola, 117p. il.
- NOMURA, H. 1976. *Ictiologia e Piscicultura. Criação do Peixe-rei*. Nobel: São Paulo. Cap. 7. 34-36.
- PAIVA, M. P. & SCHEFFER, A. C. 1982. Maturidade e Reprodução do Peixe-rei *Odonthestes bonariensis* (Valenciennes) na Bacia do rio Jacuí (Brasil). *Ciência e Cultura*, 34(12): 1650-1653.
- REGALADO, T. G. & MASTRARRIGO, V. 1954. El Pejerrey. *Piscicultura*: Buenos Aires. (268):53.
- RINGUELET, R. A. 1942. Ecología Alimentícia Del Pejerrey (*Odonthestes bonariensis*) con Notas Limnológicas sobre la Laguna Chascomus. *Revista do Museu de La Plata*: Argentina, 2(17): 427-461.
- RINGUELET, R. A., ARAMBURU, R. H., ARAMBURU, A. A. de 1967. de *Los Pesces Argentinos de Agua Dulce*. La Plata: Comission de Investigación Científica. 602p. il.



PUBLICAÇÕES PERIÓDICAS DA PUCRS

AGENDA PUCRS

Boletim Informativo interno da PUCRS - Bimestral

MUNDO JOVEM

Jornal de idéias reflexões para jovens, vinculado ao Instituto de Teologia e Ciências Religiosas - Mensal

PUCRS - INFORMAÇÃO

Boletim Informativo - Bimestral

LETRAS DE HOJE

Revista de estudos de Lingüística, Literatura e Língua Portuguesa - Trimestral

TEOCOMUNICAÇÃO

Revista de estudos de Teologia, Filosofia e áreas afins,
Órgão de comunicação do Instituto de Teologia - Trimestral

VERITAS

Revista de Filosofia e Ciências Humanas - Trimestral

ANÁLISE

Revista da Faculdade de Ciências Políticas e Econômicas - Semestral

BRASIL/BRAZIL

Revista de Literatura Brasileira e Literatura Comparada
Editada pela PUCRS, Brown University e Editora Mercado Aberto - Semestral

BIOCIÊNCIAS

Editada pelo Instituto de Biociências - Semestral

EDUCAÇÃO

Revista do Curso de Pós-Graduação em Educação - Semestral

ODONTOCIÊNCIA

Revista da Faculdade de Odontologia - Semestral

PSICO

Revista especializada em Psicologia - Semestral

COMUNICAÇÕES DO MUSEU DE CIÊNCIAS

Anual

DIREITO & JUSTIÇA

Revista da Faculdade de Direito - Sem Periodicidade

ESTUDOS IBERO-AMERICANOS

Revista de estudos sobre História e a Literatura Ibero-Americana,
do Curso de Pós-Graduação em História - Sem Periodicidade

REVISTA DE MEDICINA DA PUCRS

Editada pela Faculdade de Medicina e Instituto de Geriatria -
Sem Periodicidade

All correspondence should be addressed to:

CONSELHO EDITORIAL
Museu de Ciências da PUCRS
Av. Ipiranga, 6681, Cx. Postal 1429
90619-900 - Porto Alegre - RS - Brasil

FAX (051) 339-1564

WE ASK FOR EXCHANGE