

Hydrothermal Vents as a Possible Natural Pollution Laboratory: Metal Detoxification Mechanisms in Mussels and Fishes from Lucky Strike

R. COMPANY,^{1*} A. SERAFIM,¹ H. FELÍCIA,¹ R. COSSON,² A. FIALA-MÉDIONI³ & M. J. BEBIANNO^{1*}

¹ CIMA, University of Algarve, FCMA, Campus de Gambelas, 8000-870 Faro, Portugal

² University of Nantes, Laboratory of Marine Biology, ISOMER, BP 92208, 44322 Nantes, France

³ University P.M. Curie, Observatoire Océanologique, BP 44, 66651 Banyuls sur Mer, France

ABSTRACT

Deep-sea hydrothermal vent environments are considered highly toxic with high temperatures, sulphide, methane, carbon dioxide and heavy metals. Paradoxically, life at the vents exhibits high productivity and therefore provides a unique way to study the effect of long-term adaptation to environmental stress. The aim of this study was to compare the responses of some biomarkers of metal exposure between two hydrothermal species, the mussel *Bathymodiolus azoricus* and the chimaera fish *Hydrolagus pallidus* from Lucky Strike vent field. Results show high metal levels in *B. azoricus* compared to their coastal counterparts, especially for Ag, Cd, Cu and Zn in the gills. However, metallothionein (MT) levels were surprisingly low taking into account the metal accumulation. *H. pallidus* also exhibited significantly higher metal concentrations in the gills than the muscle, however with MT levels 2-fold higher in the muscle. Superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT) activities in the mussels were significantly higher in the gills, while glutathione peroxidases (GPx) were present mainly in the mantle, suggesting the two tissues have different antioxidant responses to deal with stress factors. Lipid peroxidation (LPO) was more evident in the gills, indicating that defence mechanisms in this tissue may not be completely effective against metal toxicity. Although the major food source for *H. pallidus* consists in metal overloaded mussels, no evidences of metal bioamplification were found. Chimaeras may possess other detoxification mechanisms that can be more important than MT.

Key words: *Bathymodiolus azoricus*, *Hydrolagus pallidus*, metallothioneins, antioxidant enzymes, lipid peroxidation.

RESUMO

Fontes hidrotermais como possíveis laboratórios naturais de poluição: mecanismos de destoxificação de metais em mexilhões e peixes de Lucky Strike

As fontes hidrotermais são consideradas ambientes extremamente tóxicos, caracterizadas por elevadas temperaturas e presença de grandes concentrações de sulfuretos, metano, dióxido de carbono e metais. Paradoxalmente, a vida nas fontes hidrotermais apresenta grande produtividade e por isso elas constituem um meio único para estudar os efeitos adaptativos a longo prazo ao stress ambiental. O objetivo deste estudo foi comparar as respostas de alguns biomarcadores de exposição metálica entre duas espécies hidrotermais, o mexilhão *Bathymodiolus azoricus* e o peixe quimera *Hydrolagus pallidus* do campo hidrotermal Lucky Strike. Os resultados mostraram que o mexilhão *B. azoricus* apresenta valores elevados de metais quando comparados com espécies costeiras aparentadas, especialmente para Ag, Cd, Cu e Zn nas brânquias. No entanto, os níveis de metalotionina (MT) foram surpreendentemente baixo tendo em conta a acumulação metálica observada. A quimera *H. pallidus* também apresentou níveis de metais significativamente superiores nas brânquias em comparação ao músculo, no entanto, os valores de MT foram duas vezes superiores no músculo. A atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT) nos mexilhões foi significativamente superior nas brânquias, enquanto as glutatona peroxidases (GPx) foram mais importantes no manto, o que sugere que os dois tecidos apresentam diferentes estratégias antioxidantes para lidar com fatores de stress. A peroxidação lipídica (LPO) foi mais evidente nas brânquias, indicando que os mecanismos de defesa nesse tecido podem não ser completamente eficazes contra a toxicidade metálica. Apesar de a principal fonte de alimento de *H. pallidus* serem mexilhões com elevados níveis de metais, não se encontraram evidências de bioamplificação de metais. As quimeras poderão apresentar outros mecanismos de desintoxicação mais importantes que as MT.

Palavras-chave: *Bathymodiolus azoricus*, *Hydrolagus pallidus*, metalotioninas, enzimas antioxidantes, peroxidação lipídica.

*Corresponding authors: M.J. Bebianno, e-mail: mbebian@ualg.pt, and Rui Company, e-mail: rcompany@ualg.pt.

INTRODUCTION

Hydrothermal vents were discovered in 1977 and since then researches were conducted to understand how organisms could survive in a very extreme environment, near vent chimneys that emanate hot, acidic and anoxic fluids, extremely enriched with metals and hydrogen sulphide that would normally be toxic in such amounts and combinations (Sarradin *et al.*, 1998). In this context, hydrothermal vents were lately thought that could be used as a possible natural pollution laboratory (Prusky & Dixon, 2002). *Bathymodiolus azoricus* is one of the most abundant species in Mid-Atlantic Ridge vents (Desbruyères *et al.*, 2000) and *Hydrolagus pallidus* is a deep-sea fish found near hydrothermal environments that feeds mainly on vent mussels (Marques & Porteiro, 2000).

Metals are known to produce deleterious effects in marine organisms at high concentrations, including the production of reactive oxygen species responsible for oxidative cellular damage (Stohs & Bagchi, 1995). Organisms developed several detoxification mechanisms to deal with metal contamination including the synthesis of metallothioneins (MT) and antioxidant enzymes. MT is a low-molecular-weight protein with high sulfhydryl content and high affinity for groups IB and IIB metal ions, thereby playing an essential role in cellular processes of metal handling and detoxification. These proteins are induced by heavy metals but also by different chemicals and stressors, in particular by oxidants (Bauman *et al.*, 1991). Antioxidant enzymes include the superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidases (GPx) (Fridovich, 1978). Lipid peroxidation (LPO) is an important feature in cellular injury, resulting from free radical reactions in biological membranes (Chessemann, 1982). Transition metals might stimulate LPO (Halliwell & Gutteridge, 1984).

The aim of this study was to determine the concentrations of Ag, Cu, Cd, Fe, Mn and Zn in *B. azoricus* and *H. pallidus* from Lucky Strike and some detoxification mechanisms such as metallothioneins (MT) in the gills and mantle of mussels and the gills and muscle of chimaeras. Antioxidant enzymes and lipid peroxidation (LPO) were only studied in mussels.

MATERIAL AND METHODS

Sample collection and preservation

Both mussels (*Bathymodiolus azoricus*, n = 10) and fishes (*Hydrolagus pallidus*, n = 6) were collected in the Lucky Strike hydrothermal vent area (37°17'N – 32°16'W; 1580-1711 m deep) during the Ventox project in summer 2001. Mussels were collected using a remote operated vehicle during the ATOS cruise on board of the research vessel Atalante (IFREMER – French Research Institute for Exploitation of the Sea). Living organisms were immediately dissected and the gills and mantle were deep frozen in liquid nitrogen until analysis. Fishes were captured using baited bottom long-line during VENTACO cruise on board of the research vessel Arquipelago (Department of Oceanography

and Fisheries – University of Azores). The fishes were already dead on arrival, which unable to determine antioxidant enzyme activities due to their fast degradation, and the gills and muscle were dissected and frozen in liquid nitrogen until analysis.

Metal analysis

The concentration of Ag, Cd, Cu, Fe, Mn and Zn were determined in both tissues of *B. azoricus* and *H. pallidus* by ET-AAS (Electrothermal atomic absorption spectrometry) or F-AAS (Flame atomic absorption spectrometry) or ICP-AES (Inductively coupled plasma-atomic emission spectrometry). Metal concentrations were expressed as $\mu\text{g.g}^{-1}$ dry weight tissue.

Biochemical analysis

MT concentrations in both tissues of mussels and fishes were determined in the heat-treated cytosol by differential pulse polarography in accordance with the method of Thompson & Cosson (1984) and Bebianno & Langston (1989). MT levels were expressed as mg g^{-1} wet weight.

Antioxidant enzyme activities were only determined in the gills and mantle of *B. azoricus* since the tissues of *H. pallidus* were collected post mortem and consequently the activity of these enzymes had ceased. Superoxide dismutase (SOD – EC 1.15.1.1), catalase (CAT – EC 1.11.1.6) and glutathione peroxidases (GPx) including total-GPx and selenium dependent-GPx (Se-GPx – EC 1.11.1.9) were determined by spectrophotometric assays at different wavelengths described by McCord & Fridovich (1969), Greenwald (1985) and Lawrence & Burk (1976) respectively. SOD activity was expressed as U mg^{-1} of total protein concentrations (one unit of SOD is the amount of the enzyme that inhibits by 50% the reduction of cytochrome c by the xanthine oxidase/hypoxanthine system at a wavelength of 550 nm), CAT as $\mu\text{moles min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ of total protein concentrations and GPx as $\text{nmoles min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ of total protein concentrations.

Lipid peroxidation was also determined only in the gills and mantle of *B. azoricus* by the method described in Erdelmeier *et al.* (1998) designed to evaluate malondialdehyde (MDA) and 4-hydroxyalkenals (4-HNE). Lipid peroxidation was expressed as $\text{nmoles of MDA and 4-HNE g}^{-1}$ of total protein concentrations.

Total protein concentrations were determined in the gills and mantle of *B. azoricus* and gills and muscle of *H. pallidus* by the Lowry method (Lowry *et al.*, 1951) using BSA (bovin serum albumin) as reference standard. Protein concentrations are expressed as mg g^{-1} wet weight tissue.

RESULTS AND DISCUSSION

The hydrothermal vent mussel *B. azoricus* shows a great capacity to accumulate metals within their tissues (Table 1). The levels of all metals are considerably higher than those found in coastal mussels like *M. edulis* or *M. galloprovincialis*, what strongly reflects the long-term exposure to high metal concentrations from hydrothermal vent fluids. The metal levels

in *B. azoricus* are significantly higher in the gills compared to the mantle, especially for Ag, Cd, Cu and Zn concentrations ($p < 0.05$). This can be associated to differences in metal uptake routes and specific physiologic functions. In bivalves the metal uptake is mostly done via the gills, as dissolved ions, and via the digestive tract as particles phagocytized by the digestive gland. Additionally, the mantle acts as reserve storage and secretion of the shell (Fiala-Medioni *et al.*, 2000).

The metal levels observed in *H. pallidus* (Table 1) were significantly lower compared to those found in *B. azoricus* ($p < 0.05$). Although these fishes depend on hydrothermal vent fauna for food supply, and therefore are frequently found near hydrothermal vents, they have been also captured in non-vent areas (Marques & Porteiro, 2000). This should reduce substantially the exposure time to metals from the vent fluids, comparatively to vent mussels that depend on hydrothermal emissions to maintain the intracellular symbiotic bacteria (both sulphur and methanotrophic) in their gills, which autotrophically synthesize organic matter directly in this tissue and therefore these mussels are continually exposed to the high metal concentration fluids (Southward *et al.*, 2001).

As observed for *B. azoricus*, also in *H. pallidus* the concentrations of most metals (Ag, Cd, Cu and Mn) were significantly higher in the gills, except for Fe (no significant differences between tissues were observed) and Zn (this metal was significantly higher in the muscle) ($p < 0.05$). This would suggest that chimaera fishes accumulate metals mainly during respiration and these metals are accumulated in the muscle in less extent. Moreover, no evidences of metal bioamplification from mussels to fishes were found.

The MT concentrations in vent mussels (Table 1) were 2-fold higher in the gills ($4.6 \pm 1.0 \text{ mg g}^{-1} \text{ w.w.}$) compared to the mantle ($2.1 \pm 0.6 \text{ mg g}^{-1} \text{ w.w.}$) ($p < 0.05$). However, higher levels of these proteins would be expected, taking into account the metal accumulation data. Furthermore, MT concentrations

in the tissues of *B. azoricus* are close to those reported to their coastal counterparts, exposed to lower metal levels in their environment. This suggests that MT in these molluscs might not be the main detoxification mechanism (Rousse *et al.*, 1998).

Contrarily, in *H. pallidus* MT levels were significantly higher in the muscle ($0.27 \pm 0.08 \text{ mg g}^{-1} \text{ w.w.}$) where lower metal concentrations were found, compared to the gills ($0.15 \pm 0.02 \text{ mg g}^{-1} \text{ w.w.}$) ($p < 0.05$). These findings were surprising since these proteins are generally associated with the metal detoxification and in this case did not followed the metal accumulation patterns observed in the two tissues, suggesting that, as hypothesized for *B. azoricus*, MT may not be the most important metal detoxification mechanism in chimaera fishes.

Stress related biomarkers were also evaluated in the tissues of *B. azoricus* (Table 2). Generally, the antioxidant enzymatic activities found in this vent mussel are close to those reported for the coastal mussel *M. galloprovincialis* from Ria Formosa lagoon (data not shown). This is surprising as higher levels of antioxidant enzymes would be expected in *B. azoricus* exposed to a great variety of toxic compounds known to enhance reactive oxygen species production from hydrothermal fluids. SOD and CAT activities were significantly higher in the gills, while the activity of both total and Se-GPx was higher in mantle tissue ($p < 0.05$).

The gills may be more susceptible to oxidative stress, as lipid peroxidation was 2-fold higher in this tissue ($187 \pm 13 \text{ nmol g}^{-1} \text{ total proteins}$) compared to the mantle ($99 \pm 10 \text{ nmol g}^{-1} \text{ total proteins}$).

CONCLUSIONS

B. azoricus accumulate higher metal concentrations than coastal mussels and chimaera fishes suggesting a long-term exposure to metal rich hydrothermal fluids. The gills are the main target tissue for metal accumulation.

Table 1 — Metal ($\mu\text{g g}^{-1} \text{ d.w.}$) and MT concentrations ($\text{mg g}^{-1} \text{ prot}$) in *B. azoricus* and *H. pallidus* from Lucky Strike hydrothermal field. Data are expressed as means $\pm$ standard error.

Species	Tissues	Ag	Cd	Cu	Fe	Mn	Zn	MT
<i>B. azoricus</i>	Gills	5.2 ± 1.2	47.2 ± 10.0	79.7 ± 19.4	303 ± 63	7.6 ± 1.9	1976 ± 570	4.6 ± 1.0
	Mantle	0.8 ± 0.2	2.9 ± 1.0	14.2 ± 3.5	235 ± 61	5.8 ± 1.5	124 ± 37	2.1 ± 0.6
<i>H. pallidus</i>	Gills	0.6 ± 0.02	0.37 ± 0.1	4.7 ± 0.9	185 ± 43	5.7 ± 1.3	172 ± 48	0.15 ± 0.02
	Muscle	0.08 ± 0.03	0.05 ± 0.01	1.1 ± 0.3	168 ± 48	2.8 ± 1.0	252 ± 101	0.27 ± 0.08

Table 2 — Activities of antioxidant enzymes and lipid peroxidation levels in the hydrothermal mussel *B. azoricus*.

Tissues	SOD	CAT	Total GPx	Se-GPx	LPO
	($\text{U mg}^{-1} \text{ prot}$)	($\mu\text{mol mg}^{-1} \text{ prot}$)	($\text{nmol mg}^{-1} \text{ prot}$)	($\text{nmol mg}^{-1} \text{ prot}$)	($\text{nmol g}^{-1} \text{ prot}$)
Gills	19.1 ± 2.9	17.5 ± 4.9	8.7 ± 1.8	6.8 ± 1.1	187 ± 13
Mantle	14.4 ± 1.6	6.0 ± 1.3	18.5 ± 3.2	15.6 ± 2.1	99 ± 10

Despite the metal concentration antioxidant enzymatic defences are close to those reported in coastal mussels, suggesting a controlled production of ROS in such toxic environment.

MT levels in these mussels are also low, suggesting these proteins are not the major metal detoxification mechanism.

H. pallidus have significantly lower metal levels than the mussels reflecting smaller exposure to hydrothermal fluids and showing no evidences of metal bioamplification.

Like mussels, chimaera fishes accumulate considerably more metals in the gills.

MT, on the other hand, are significantly higher in the muscle tissue not reflecting the metal contamination.

Acknowledgements — The authors are grateful to Pierre Marie Sarradin (IFREMER), chief scientist during ATOS cruise, Afonso Marques chief scientist during VENTACO cruise and David Dixon, Ventox Project coordinator. We wish to express our thanks to the captain and crews of the research vessels Atalante and Arquipelago, ROV-Victor team, director and staff of IMAR DOP (University of Azores). This study was supported by an FCT Ph.D. Grant (SFRH/904/2000) and the European Project VENTOX (EVK3 CT1999-00003).

REFERENCES

- BAUMAN, J. W., LIU, J., LIU, Y. P. & KLAASSEN, C. D., 1991, Increase in metallothionein produced by chemicals that induce oxidative stress. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 110: 347-354.
- BEBIANNO, M. J. & LANGSTON, W. J., 1989, Quantification of metallothioneins in marine invertebrates using differential pulse polarography. *Port. Electrochim. Acta.*, 7: 511-523.
- CHESSEMAN, K. M., 1982, Effects of scavengers and inhibitors on lipid peroxidation in rat liver microsomes. In: D. C. MacBrien & T. F. Slater (eds.), *Free radicals, lipid peroxidation and cancer*. Academic Press, New York.
- DESBRUYÈRES, D., ALMEIDA, A., BISCOITO, M., COMTET, T., KHRIPOUNOFF, N. LE BRIS, N., SARRADIN, P. M. & SEGONZAC, M., 2000, *Hydrobiologia*, 440: 201-216.
- ERDELMEIER, I., GERARD-MONNIER, D., YADAN, J. C. & ACUDIERE, J., 1998, Reactions of N-methyl-2-phenylindole with malondialdehyde and 4-hydroxyalkenals. Mechanistic aspects of the colorimetric assay of lipid peroxidation. *Chem. Res. Toxicol.*, 11: 1184-1194.
- FIALA-MÉDIONI, A., ROUSSE, N., COSSON, R. P., BOULÈGUE, J. & SARRADIN, P. M., 2000, Bioaccumulation and detoxification of heavy metals in *Bathymodiolus azoricus* (Von Cosel et al., 1998) from Azores hydrothermal vents on Mid-Atlantic Ridge. 7th FECS Conference on Chemistry and the Environment, Metal Speciation in the Aquatic Environment, Oporto (Portugal), pp. 30.
- FRIDOVICH, I. A., 1978, The biology of oxygen radicals. *Science*, 201: 875-880.
- GREENWALD, R. A., 1985, *Handbook of methods for oxygen radical research*. CRC Press, Boca Raton, FL.
- HALLIWELL, B. & GUTTERIDGE, M. C., 1984, Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochem. J.*, 34: 183-193.
- LAWRENCE, R. A. & BURK, R. F., 1976, Glutathione peroxidase activity in selenium-deficient rat liver. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 71: 952-958.
- LOWRY, O. H., ROSENBROUGH, N. J., FARR, A. L. & RANDALL, R. J., 1951, Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193: 265-275.
- MARQUES, A. & PORTEIRO, F., 2000, Hydrothermal Vent Mussel *Bathymodiolus* sp. (Mollusca: Mytilidae): Diet Item of *Hydrolagus affinis* (Pisces: Chimaeridae). *Copeia*, (3): 806-807.
- MCCORD, J. M. & FRIDOVICH, I., 1969, Superoxide dismutase: an enzymatic function for erythrocuprein (hemocuprein). *J. Biol. Chem.*, 244(22): 6049-6055.
- PRUSKY, A. M. & DIXON, D. R., 2002, Effects of cadmium on nuclear integrity and DNA repair efficiency in the gill cells of *Mytilus edulis* L. *Aquat. Toxicol.*, 57: 127-137.
- ROUSSE, N., BOULEGUE, J., COSSON, R. P. & FIALA-MÉDIONI, A., 1998, Bioaccumulation des métaux chez le mytilidae hydrothermal *Bathymodiolus* sp. De la ride médio-atlantique. *Oceanol. Acta*, 21(4): 597-607.
- SARRADIN, P. M., CAPRAIS, J. C., BRIAND, P., GAILL, F., SHILLITO, B. & DESBRUYÈRES, D., 1998, Chemical and thermal description of the environment of the Genesis hydrothermal vent community (13°N, EPR). *Cahiers de Biologie Marine de Roscoff*, 38: 159-167.
- SOUTHWARD, E. C., GEBRUK, A., KENNEDY, H., SOUTHWARD, A. J. & CHEVALDONNE, P., 2001, Different energy sources for three symbiont-dependent bivalve mollusks at the logachev hydrothermal site (Mid-Atlantic Ridge). *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 81: 655-661.
- STOHS, S. J. & BAGCHI, D., 1995, Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions. *Free Radic. Biol. Med.*, 8(2): 321-336.
- THOMPSON, J. A. J. & COSSON, R. P., 1984, An improved electrochemical method for the quantification of metallothionein in marine organisms. *Mar. Environ. Res.*, 11: 137-152.

Ação de Detergente Doméstico na Biologia Reprodutiva do Camarão de Água Doce *Macrobrachium olfersi*

L. C. MARTINS, R. D. DA ROSA, L. D. RIVERO, E. M. NAZARI & Y. M. R. MÜLLER*

Laboratório de Reprodução e Desenvolvimento Animal, Departamento de Biologia Celular, Embriologia e Genética, Universidade Federal de Santa Catarina, C.P. 476, CEP 88010-970, Florianópolis, Santa Catarina

RESUMO

O objetivo deste estudo é avaliar os efeitos de detergente de uso doméstico na glândula digestiva, no desenvolvimento embrionário e na reprodução de *M. olfersi*. Camarões foram mantidos em dois aquários (21,5 L de água deionizada): o experimental (aquário I) e o controle (aquário II). Uma dose de 0,075% de detergente doméstico foi adicionada ao aquário I, onde os camarões foram monitorados até o 140º dia de exposição. Durante esse tempo, a maturação gonadal foi acompanhada e os ovos foram removidos das fêmeas ovígeras e medidos. O desenvolvimento foi caracterizado através da morfologia externa dos embriões em cada dia de incubação. Fêmeas dos dois aquários foram crioadestesiadas, sendo o hepatopâncreas e ovários dissecados, fixados em Bouin (24 h), incluídos em parafina e seccionados (8 µm). Ambos os órgãos foram corados com HE e o hepatopâncreas, com Hoescht 33258. Os resultados mostram que a região secretora do hepatopâncreas (aquário II) apresenta tubos constituídos por células B secretoras com evidente aparato vacuolar. Os animais expostos ao detergente mostraram decréscimo no número de células B secretoras e significativa redução do aparato vacuolar. No grupo experimental foi observada redução no tempo de desenvolvimento embrionário, de 14 dias no grupo controle para 11 dias no grupo experimental. O volume dos ovos nos estágios de disco-germinal e pós-nauplius final (tanque I) foram de 0,045 e 0,067 mm³, respectivamente. O volume dos ovos do controle foi, nos mesmos estágios embrionários, de 0,044 e 0,075 respectivamente. Estes resultados sugerem que o detergente de uso doméstico tem efeito negativo sobre a performance reprodutiva de *M. olfersi*.

Palavras-chave: *Macrobrachium olfersi*, detergente, reprodução, desenvolvimento embrionário.

ABSTRACT

Effects of domestic detergents on the reproductive biology of the prawn *Macrobrachium olfersi*

The aim of this study is evaluate the effects of domestic detergents in the digestive gland, embryonic development and in the reproduction of *M. olfersi*. Prawns were maintained in two tanks with 21.5 L of deionized-water: the experimental (tank I) and the control (tank II). One dose of 0.075% of domestic detergent was added to the tank I, and the prawns were monitored on 140th exposure day. During this time, the gonadal maturation was monitored, the eggs were removed from the ovigerous females and measured. Development was characterized through of external morphology of the embryos in each incubation day. Females from the two tanks were cooled and the hepatopancreas and ovaries were dissected and fixed in Bouin (24 h), embedded in paraffin and sectioned (8 µm). Both organs were stained with HE and the hepatopancreas was also stained with Hoescht 33258. The results show that the secretory region of hepatopancreas (tank II) present tubules constituted by B-cells with an evident vacuolar apparatus. The animals exposed to detergent showed a decrease in the number of B-cells and significant reduction of vacuolar apparatus. In the experimental group was observed a reduction in the embryonic development time from 14 days in control group to 11 days in the experimental group. The egg volume of germinal-disk stage and final post-nauplius (tank I) were 0.045 and 0.067 mm³, respectively and the egg volume of the control was, in the same embryonic stages, 0.044 and 0.075 mm³, respectively. These results suggest that the domestic detergent have a negative effect on the reproductive performance of *M. olfersi*.

Key words: *Macrobrachium olfersi*, detergent, reproduction, embryonic development.

*Corresponding author: Yara Maria Rauh Müller, e-mail: yararm@ccb.ufsc.br.

INTRODUÇÃO

Entre os crustáceos da família Palaemonidae, o gênero *Macrobrachium* é o que apresenta a maior distribuição no Brasil (Bond-Buckup & Buckup, 1989), sendo que, das espécies deste gênero descritas para a Ilha de Santa Catarina, *Macrobrachium olfersi*, conhecida popularmente como pitu, destaca-se por habitar corpos de água doce e salobra, por sua representatividade e periodicidade e pela adaptabilidade às condições experimentais, requisitos essenciais ao adequado andamento de estudos de laboratório (Nazari et al., 2003).

De modo geral nos palemonídeos, a visualização dos ovários é facilitada pela transparência da carapaça do cefalotórax, em que é possível acompanhar os estágios de maturação pelas mudanças em sua coloração, tamanho e forma (Arculeo et al., 1995). Além disso, possuem uma câmara incubadora externa, onde os ovos permanecem até a eclosão, e, devido à transparência do córion, é possível caracterizar a morfologia dos embriões durante todo o período de incubação (Müller et al., 2003, 2004).

O processo reprodutivo é controlado por mecanismos endógenos através de hormônios produzidos pelo sistema endócrino-peduncular (Wilder et al., 1994). Contudo, por se tratar de invertebrados aquáticos, estas funções apresentam também forte dependência das variações de fatores exógenos, como temperatura, salinidade e fotoperíodo (Díaz et al., 2003). Outro fator relevante para a reprodução é a alimentação das fêmeas, pois as características do vitelo dependem diretamente da sua dieta, sendo o hepatopâncreas responsável pelo metabolismo dos nutrientes indispensáveis ao processo reprodutivo.

Os organismos aquáticos encontram-se num meio onde estão naturalmente diluídos vários elementos, inclusive poluentes. Normalmente, devido à sua diluição, os efeitos dos poluentes aquáticos não podem ser imediatamente reconhecidos nos organismos, tendo-se dificuldade de compreender maiores implicações no ambiente (Blockwell et al., 1998).

Estudos realizados em nosso laboratório sugerem que detergentes domésticos, freqüentes nos efluentes urbanos, influenciam o repertório comportamental, a reprodução e o desenvolvimento embrionário das espécies nativas de palemonídeos.

Por serem sensíveis às alterações ambientais, os crustáceos são considerados indicadores de contaminação aquática (Rinderhagen et al., 2000), auxiliando em trabalhos que visam a identificar ambientes alterados, com fins de preservação e manutenção do equilíbrio trófico.

Este estudo visa a avaliar o efeito de detergente de uso doméstico sobre a glândula digestiva, o desenvolvimento embrionário e a reprodução de *M. olfersi* coletados em corpos de água doce da Ilha de Santa Catarina, onde é lançada grande parte dos efluentes urbanos.

MATERIAIS E MÉTODOS

Exemplares adultos de *M. olfersi* foram coletados no Parque Municipal da Lagoa do Peri (27°43'S e 48°32'W) – IBAMA nº 10/04. A captura foi realizada com puçá (malha 0,5 cm) passado entre as pedras de fundo e na vegetação submersa, sendo os animais capturados transportados para o laboratório em recipientes com água do local de coleta e aeração constante. Em laboratório foram realizadas a pesagem e a determinação do comprimento total dos exemplares, bem como a sexagem, através da análise dos caracteres sexuais secundários, sendo os indivíduos separados em machos, fêmeas e fêmeas ovígeras.

Foram montados dois aquários (aquário I: experimental; aquário II: controle) nas dimensões de 30 cm × 30 cm × 50 cm, com 21,5 L de água deionizada, sedimento arenoso e pedras para abrigo. A temperatura foi controlada a 24°C (±1°C) e salinidade em 0‰ (Müller et al., 1999). Machos, fêmeas e fêmeas ovígeras foram mantidos com aeração constante e alimentação diária. No aquário I foi adicionado detergente de uso doméstico, na concentração de 0,075%, e o aquário II foi mantido nas mesmas condições, porém sem a adição do detergente.

Os animais foram monitorados diariamente, sendo a maturação ovariana acompanhada macroscopicamente, através da mudança de coloração e do tamanho dos ovários, visualizados devido à transparência da carapaça do cefalotórax.

As fêmeas ovígeras tiveram uma amostra de ovos (n = 50) retirada diariamente, a qual foi submetida à análise morfológica *in vivo* (10X e 40X), para reconhecimento das estruturas embrionárias típicas de cada estágio do desenvolvimento (Müller et al., 2003). Os ovos foram medidos com ocular micrométrica (40X), sendo obtidos os valores (mm) dos eixos (l) longitudinal e (h) transversal, para o cálculo do volume através da fórmula $v = \pi l h^2 / 6$ (Odinetz-Colart & Rabelo, 1996).

Após 140 dias de exposição, as fêmeas foram crionestesiadas e dissecadas para retirada do hepatopâncreas e ovários, que foram em seguida fixados em Bouin (24 h), sendo posteriormente desidratados em série etanólica crescente, incluídos em parafina e seccionados (8 µm). Ambos os órgãos foram corados pela técnica Hematoxilina-Eosina (HE). O hepatopâncreas foi submetido ainda à técnica de Hoescht 33258 para detecção de sítios apoptóticos, sendo as lâminas imersas em tampão Mc Ilvaine (5 minutos) e transferidas para solução de Hoescht 33258/tampão Mc Ilvaine (1:2000) (12 minutos). Em seguida, foram lavadas em água destilada, montadas com tampão Mc Ilvaine e vedadas com esmalte.

A análise morfométrica dos órgãos foi realizada a partir das medidas do diâmetro das ovogônias, dos ovócitos pré-vitelogênicos e vitelogênicos, bem como dos vacúolos das células secretoras do hepatopâncreas, através de ocular micrométrica (100X).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A morfologia geral do hepatopâncreas dos grupos controle e experimental mostrou-se bastante similar. A estrutura da região medular do órgão, em corte transversal, do grupo experimental não sofreu modificação. Através das técnicas utilizadas, não foi possível observar alterações no número e na microestrutura dos ácinos dos grupos analisados. Contudo, pôde-se constatar redução de 42% no diâmetro dos vacúolos das células B secretoras, presentes nos ácinos dos animais expostos ao detergente. O diâmetro médio dos vacúolos dessas células do grupo controle foi de 27,78 μm , enquanto os do grupo experimental tinham em média 16,14 μm (Tabela 1).

O número de células nos tecidos do hepatopâncreas mostrou-se bastante semelhante entre os dois grupos. Através da técnica de Hoescht não foi possível detectar apoptose das células acinares e das células epiteliais que revestem as paredes dos túbulos dessa glândula. O efeito do detergente sobre a estrutura celular do hepatopâncreas pode ser explicado pelo fato de os camarões se alimentarem no sedimento, onde provavelmente se acumulam grandes quantidades de contami-

nantes (Blockwell *et al.*, 1998), os quais são transferidos diretamente para a glândula digestiva.

A maturação ovariana pôde ser observada de maneira semelhante no aquário experimental e no controle, mostrando que o detergente não afetou a sucessão dos estágios, podendo ser reconhecida a seguinte seqüência de maturação: imaturo, maturação inicial, intermediária e maduro. Através da análise histológica e morfométrica dos ovários maduros observou-se, principalmente, redução no diâmetro dos ovócitos vitelogênicos dos organismos do grupo experimental (Figura 1).

A redução no diâmetro das células germinativas pode estar relacionada à diminuição das células B do hepatopâncreas, uma vez que estas, entre outras funções, são responsáveis pela síntese e secreção de precursores para a formação do vitelo nas células germinativas. O detergente pode ter interferido na atividade das células B secretoras, o que pode ser constatado pela redução do seu aparato vacuolar. Assim, pode ter ocorrido diminuição da produção protéica no hepatopâncreas e, conseqüentemente, redução na disponibilidade desses compostos para as células germinativas, ocasionando redução no seu diâmetro.

Tabela 1 — Diâmetro dos vacúolos das células B secretoras de hepatopâncreas de *M. olfersi* dos grupos controle e experimental.

Grupo	Diâmetro dos vacúolos (μm)			
	Mínimo	Máximo	Média	DP ($\pm$)
Controle	16,75	46,85	27,78	7,69
Experimental	10,39	23,74	16,14	3,57

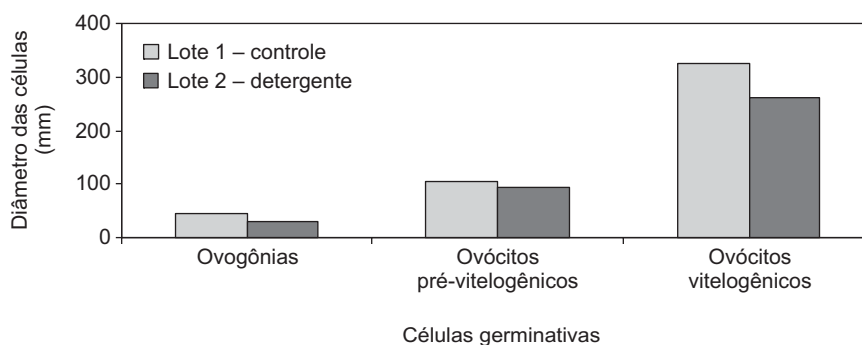


Figura 1 — Valores do diâmetro das células germinativas de ovários de *M. olfersi* dos grupos controle e experimental.

O acompanhamento do desenvolvimento embrionário dos ovos das fêmeas ovígeras dos grupos experimental e controle possibilitou a observação de alterações no tempo de desenvolvimento e na morfologia geral dos embriões. O tempo médio de desenvolvimento embrionário dos ovos do aquário controle foi de 14 dias, corroborando os dados apresentados por Müller *et al.* (2003, 2004). Os ovos expostos ao detergente desenvolveram-se num período menor de 11 dias. Os estágios iniciais de desenvolvimento observados nos dois grupos foram bastante similares, sendo possível observar as estruturas pré-naupliares e naupliares típicas. Contudo, sugere-se que os estágios finais da embriogênese do grupo experimental foram mais acelerados, ocasionando a redução no tempo de desenvolvimento.

Observaram-se anormalidades morfológicas nos ovos e embriões do grupo experimental, sendo constatadas alterações no tamanho, cor e forma dos ovos, bem como na pigmentação do corpo e olhos dos embriões. Anormalidades morfológicas induzidas por compostos inorgânicos foram observadas por Ohta *et al.* (1998) em ovos de *Daphnia magna*, sendo reportadas principalmente malformações de carapaça. Neste mesmo estudo foi constatado que o tempo de desenvolvimento foi mais prolongado nos indivíduos tratados do que no grupo controle.

Na maioria das desovas analisadas notou-se alteração no volume dos ovos, não sendo possível estabelecer um padrão de variação por fêmea. Nos estágios iniciais do desenvolvimento (disco-germinal – E3), a média do volume dos ovos foi semelhante entre o grupo experimental (0,045 mm³) e controle (0,044 mm³). Contudo, nos estágios finais (pós-nauplius final – E11) foram observadas diferenças mais expressivas, com o volume dos ovos dos grupos experimental e controle sendo respectivamente de 0,067 e 0,075 mm³.

Nossos resultados mostram que o detergente influencia o funcionamento dos órgãos analisados, afetando também o desenvolvimento embrionário, evidência da importância dos fatores exógenos na reprodução desses animais. A diminuição da performance reprodutiva tem sido reportada em outros estudos como um efeito subletal de contaminantes em ambientes de água doce (Blockwell *et al.*, 1998). Estudos mostram o uso de palaemonídeos como modelo animal adequado para determinação da toxicidade de metais, agentes químicos e biológicos (Rayburn & Fisher, 1997; Oberdörster *et al.*, 1999; Mariño-Balsa *et al.*, 2000).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARCULEO, M., PAYEN, G., CUTTITTA, A., GALIOTO, G. & RIGGIO, S., 1995, A survey of ovarian maturation in a population of *Aristeus antennatus* (Crustacea: Decapoda). *Anim. Biol.*, 4: 13-18.
- BOND-BUCKUP, G. & BUCKUP, L., 1989, Os Palaemonidae de águas continentais do Brasil meridional (Crustacea, Decapoda). *Rev. Brasil. Biol.*, 49(4): 883-896.
- BLOCKWELL, S. J., TAYLOR, E. J., JONES, I. & PASCOE, D., 1998, The influence of fresh water pollutants and interaction with *Asellus aquaticus* (L.) on the feeding activity of *Gammarus pulex* (L.) *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 34: 41-47.
- DÍAZ, A. C., SOUSA, L. G., CUARTAS, E. I. & PETRIELLA, A. M., 2003, Growth, molt and survival of *Palaemonetes argentinus* (Decapoda, Caridea) under different light-dark conditions. *Iheringia*, 93(3): 249-254.
- MARIÑO-BALSA, J. C., POZA, E., VÁZQUEZ, E. & BEIRAS, R., 2000, Comparative toxicity of dissolved metal to early larval stages of *Palaemon serratus*, *Manja squinaldo*, and *Homarus gammarus* (Crustacea: Decapoda). *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 39: 345-351.
- MÜLLER, Y. M. R., NAZARI, E. M., AMMAR, D., FERREIRA, E. C., BELTRAME, I. T. & PACHECO, C., 1999, Biologia dos Palaemonidae (Crustacea, Decapoda) da bacia hidrográfica de Ratonés, Florianópolis, Santa Catarina, Brasil. *Revta. Bras. Zool.*, 16(3): 629-636.
- MÜLLER, Y. M. R., NAZARI, E. M. & SIMÕES-COSTA, M. S., 2003, Stages in the embryonic development of the freshwater prawn *Macrobrachium olfersi* (Decapoda, Palaemonidae). *Jour. Crust. Biol.*, 23(4): 670-676.
- MÜLLER, Y. M. R., AMMAR, D. & NAZARI, E. M., 2004, Embryonic development of four species of palaemonid prawns (Crustacea, Decapoda): pre-naupliar, naupliar and post-naupliar periods. *Revta. Bras. Zool.*, 21(1): 27-32.
- NAZARI, E. M., SIMÕES-COSTA, M. S., MÜLLER, Y. M. R., AMMAR, D. & DIAS, M., 2003, Comparisons of fecundity, egg size, and egg mass volume of the freshwater prawns *Macrobrachium potiana* and *Macrobrachium olfersi* (Decapoda, Palaemonidae). *Jour. Crust. Biol.*, 23(4): 862-868.
- OBBERDÖRSTER, E., MARTIN, M., IDE, C. F. & MCLACHLAN, J. A., 1999, Benthic community structure and biomarker induction in grass shrimp in an estuarine system. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 37: 512-518.
- ODINETZ-COLART, H. & RABELO, C., 1996, Variation in the egg size of the freshwater prawn *Macrobrachium amazonicum* (Decapoda, Palaemonidae). *Jour. Crust. Biol.*, 16(4): 684-688.
- OHTA, T., TOKISHITA, S., SHIGA, Y., HANAZATO, T. & YAMAGATA, H., 1998, An assay system for detecting environmental toxicants with cultured cladoceran eggs in vitro: malformations induced by ethylenethiourea. *Environ. Resear., Section A*, 77: 43-48.
- RAYBURN, J. R. & FISCHER, W. S., 1997, Developmental toxicity of three carrier solvents using embryos of the grass shrimp, *Palaemonetes pugio*. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 33: 217-221.
- RINDERHAGEN, M., RITTERHOFF, J. & ZAUKE, G. P., 2000, Crustaceans as bioindicators. Biomonitoring of polluted water – Reviews and Actual Topics (A. Gerhardt, ed.). Trans Tech Pub Seitech Publications. *Environmental Research Forum*, 9: 1-34.
- WILDER, M. N., OKUMURA, T., SUZUKI, Y., FUSETANI, N. & AIDA, K., 1994, Vitellogenin production induced by eyestalk ablation in juvenile giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* and trial methyl farnesoate administration. *Zool. Sci.*, 11: 45-53.