

B10-04

R.E. 26C

X

DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

TRABALHO DE LICENCIATURA

**EFEITO DA CONSERVAÇÃO EM FORMOL DE ORGANISMOS
BENTÓNICOS NA DETERMINAÇÃO DA SUA BIOMASSA**

Autora: Paula Cristina J. Schwalbach

SUPERVISORES: dr. Fred de Boer

dr. Almeida Guissamulo

Maputo, Junho de 1996



Agradecimentos

Agradeço a todos os que, directa ou indirectamente me prestaram apoio, para a realização deste trabalho:

a) Pelo apoio científico

dr. Fred de Boer
dr. Almeida Guissamulo
dr. Luís Schwalbach

b) Pelo apoio moral

Aos meus pais e irmãos
César Domingos (marido)

Dedicatória

Dedico este trabalho aos meus pais

SUMÁRIO

Normalmente tem sido usado o formol a uma solução estandarte de 4% como preservante (conservante) de vários organismos, e nunca se pensou no facto de este poder influenciá-los ao longo do tempo da sua conservação. Por essa razão torna-se interessante estudar a influência deste conservante nos organismos preservados.

Para este trabalho foram estudadas três espécies nomeadamente *Donax faba*, *Dotila fenestrata* e *Idanthyrsus Pennatus* sendo cada espécie representada por 3 grupos de tamanhos diferentes de modo a analisar-se o efeito deste conservante, sobre os diferentes tamanhos das espécies, e as diferentes reacções de espécie para espécie ao longo do tempo de conservação.

Para esse fim, foram feitas 3 análises para todos os grupos de tamanhos das 3 espécies, nomeadamente após 7, 30, 60 dias e aos 90 (apenas parcialmente) de conservação.

O AFDW foi medido através do peso seco e do peso das cinzas.

Introduziu-se um valor de um factor de correcção, e fez-se a análise da variância através do método Two-Way ANOVA, fez-se os testes de multipla comparação (Teste LSD - "least significant difference" e teste de Duncan). E a regressão linear do tipo $y=ax+b$.

I. Introdução

A macrofauna bentónica consiste de organismos de dimensões superiores a 1mm (Sumich, 1977 citado em Freitas 1992), ficando portanto retidos em crivos de 1mm de tamanho da malha, e que habitam os sedimentos ou as superfícies marinhas (Gage e Taylor, 1993).

A nível mundial já foram feitos vários estudos de modo a avaliar o conteúdo energético presente nos macrobentos e disponível para outros níveis tróficos. Esse valor expressa-se usualmente em termos de AFDW (ash free dry weigh), - peso seco sem cinzas. Este tipo de estudos, foi realizado por exemplo no Banco d'Arguin na Mauritania (Wolf *et al.*, 1993) e a Norte do Mar Báltico (Lappalainen e Kangas, 1974).

Um problema enfrentado pelos ecologistas é o de manter os organismos o mais próximo possível do estado original em que são colhidos, até se poderem efectuar as análises no laboratório (Ivell, 1981).

O formol tem sido usado à mais de um século como líquido conservante de diversas espécies e consiste numa solução aquosa de 37 gramas de formaldeído em 100 ml de água (Alcamo, 1990).

O formaldeído é um agente alquilante que reage com os grupos amino, hidroxilo e carboxílico dos ácidos nucleicos e das proteínas, formando pontes com os grupos adjacentes, alterando a sua estrutura química (Alcamo, 1990), permitindo assim a sua preservação ao longo do tempo.

Nem sempre é possível processar o material imediatamente após a sua recolha, principalmente quando as distâncias entre o campo da amostragem e o laboratório são longas. Uma possibilidade é manter os animais vivos até chegarem ao laboratório, mas esta prática não é recomendável em climas quentes, pois pode haver perdas significativas de glicogénio. Uma alternativa comum é a preservação por congelamento ou o uso de conservantes como o formol e o etanol (Ivell, 1981).

O formol tende a tornar-se ácido com a conservação, causando danos às espécies. Por essa razão tem sido adicionado a este preservante um tampão como o bórax ou a hexamina. Estas substâncias têm sido criticadas por causarem desintegração das etiquetas ou produzirem um precipitado. No entanto, certos estudos reportam que talvez seja menos danificante prevenir a acidez através da adição de lascas de mármore ao formol (Birkett e McIntyre, 1971).

Mark *et al.* (1981) e Lappalainen e Kangas, (1974) reportam uma perda de biomassa na *Ceriodaphnia lacustris* (um crustáceo) após a sua conservação em formol.

Têm sido feitos vários estudos na Ilha da Inhaca com o uso de formol na conservação de espécies, como é o caso do estudo de géneros de caranguejos (Afonso, em preparação) e outros organismos bentónicos, exemplo: Bivalves, Gastrópodes e Crustáceos. (Longamane, 1995).

A Ilha da Inhaca, no sul de Moçambique essencialmente voltada à actividade piscatória, tem grandes extensões de areia na linha da costa, expostas durante a vasante das marés, ricas em espécies procuradas por certos predadores como as aves e que representam uma importante fonte de alimentos para a população humana desta ilha. Macnae e Kalk, (1969), consideraram-nas um importante campo de colheita de fauna bentónica.

Visto que nos vários trabalhos realizados se utilizou o formol como conservante, e não foi estudado o efeito que este tem sobre os animais conservados, o presente trabalho pretende estudar o efeito do formol sobre a biomassa dos animais durante a sua conservação, e calcular o valor para um factor de correcção da biomassa ao longo do periodo de conservação.

Neste trabalho foram consideradas as seguintes hipóteses:

“Quanto mais longo fôr o tempo de conservação em formol, maior será a perda de biomassa dos organismos”

e

“Quanto maior fôr o tamanho dos organismos bentónicos, conservados em formol, menor será a perda relativa do seu material orgânico”.

Justificação:

Os animais maiores têm um volume maior em relação à sua superfície de contacto com o formol, ao contrário dos animais menores que têm uma maior razão superfície/volume, e assim estes últimos terão uma maior perda relativa do seu material orgânico durante a sua conservação, por efeito do formol.

II. Objectivos

1. Determinar a influência do conservante formol a uma diluição estandarte de 4% sobre a biomassa de *Idannthysus pennatus* (Polichaeta), *Dotila fenestrata* (Crustacea) e *Donax faba* (Bivalves) de três tamanhos diferentes ao longo do tempo.
2. Determinar um factor de correcção (numérico), para a biomassa conservada em formol, dependendo do seu periodo de conservação, por forma a estimar a qualquer momento, a biomassa no momento da colheita.

III. Localização da Área de Recolha da Macrofauna Bentónica:

A Ilha da Inhaca está situada no Oceano Índico à latitude de 26°S e longitude 33°E, desviada 32Km Este de Maputo (Kalk, 1995).

A Ilha de Inhaca estende-se a 12,5Km do seu ponto Norte, Ponta Mazondue, ao ponto Sudeste, Ponta Torres. A ilha tem uma forma de "H" distorcido porque as suas costas Norte e Sul são profundamente acidentadas pela baía (Kalk, 1995); ver mapa 1 no anexo 1.

A temperatura média registada desde 1951 na Estação de Biologia Marítima (EBM) é de 25°C. A precipitação média anual é de 900mm. A humidade relativa na costa Oeste é de cerca de 77% e a evaporação total é de cerca de 25% maior nos meses de verão do que no inverno, alcançando 105mm em Janeiro (Kalk, 1995).

O estudo realiza-se na Ilha da Inhaca por ser uma zona de fácil e rápido acesso aos organismos bentónicos e permite a colheita rápida e em quantidades relativamente elevada que o estudo exige.

A recolha da *Dotila fenestrata*, da *Donax faba* e da *Idannthysus pennatus*, para este estudo foi feita na zona de frente à Estação de Biologia Marítima-EBM, no Saco da Inhaca e no Farol respectivamente, por ser a zona de maior abundância de cada espécie respectiva.

IV. Métodos

Foram estudadas as seguintes espécies para cada classe de Polichaetas, Crustacea e Bivalves respectivamente: *Idanthyrsus pennatus*, *Dotila fenestrata* e *Donax faba*, por serem abundantes permitindo assim uma rápida colheita e em número elevado o que é importante para o presente estudo, e porque são os animais mais colhidos nos estudos já feitos.

De cada espécie, foram escolhidas três classes de tamanhos diferentes, para verificar o tipo de relação entre a perda de biomassa e o tempo de conservação em formol. Foram estudadas três classes por espécie, para verificar (na eventualidade de existir) se a relação entre a percentagem de biomassa e o tamanho é linear ou exponencial.

De cada classe de tamanhos de exemplares de cada espécie, foram colhidos e analisados 40 exemplares, para cada tipo de tratamento. Este tamanho da amostra, assim como as classes de tamanho para cada espécie, foram determinadas após um estudo preliminar, que se obteve através da curva de rendimento (gráficos nos anexos 2 e 3).

Preparação do conservante

O borax (borato de sódio) foi previamente misturado ao formol de modo a neutralizar os ácidos existentes neste, (Wickstead, 1966). Sendo à proporção de 30 gramas de borato de sódio para 1 litro de formol a 37 % (Timothy et al., 1984) que mais tarde se diluiu à concentração de 4% .

A concentração de 4% foi preparada através da diluição de 100ml de formol a 37% e 900ml de água do mar.

A concentração de 10% (proposta no protocolo original) foi cancelada devido à falta de um número elevado das espécies em estudo e ainda, ao facto da concentração de 4% ser a mais utilizada.

Trabalho no campo

A amostragem foi feita no mesmo dia, na mesma maré para cada espécie em dias sucessivos de modo a reduzir as variações que surgiriam em caso de distanciamento da colheita das amostras.

A colheita de rochas contendo *Idanthyrsus pennatus* (Polichaeta) foi realizada com a ajuda de uma pá na vasante das marés vivas na zona do Farol. Estas rochas foram transportadas num balde com água do mar para o laboratório da EBM da Inhaca. Aqui,

procedeu-se à extracção das Polichaetas, com a ajuda de um martelo. Os *Dotila fenestrata* (Crustáceos) e os *Donax faba* (Bivalve) foram colhidos manualmente, com a ajuda de uma pá nas zonas do Saco da Inhaca e de frente à EBM respectivamente.

Os organismos intactos depois de colhidos, foram colocados em frascos de vidro que já continham formol a 4% e borax de modo a matá-los, evitando assim que uns atacassem e danificassem os outros (caso dos caranguejos).

Trabalho no laboratório

a) Na Ilha da Inhaca

As amostras foram agrupadas em 3 tamanhos diferentes para cada espécie logo após a colheita.

Os tamanhos dos polichaetos foram medidos com uma craveira graduada com a precisão de 1 mm de modo a terem o mesmo tamanho e depois foram cortados com um bisturi em 1, 2, e 3 mm respectivamente, para garantir que todos tivessem a mesma espessura.

No crustaceo *Dotila fenestrata* foi medido o tamanho da carapaça na zona mais larga (largura), e no Bivalve *Donax faba* foi medido o comprimento máximo da concha de lado a lado através de craveiras graduadas com a precisão de 1 mm (Birkett e McIntyre, 1971).

Para cada classe de tamanho de cada espécie e para cada tipo de tratamento, foi utilizado um frasco, de vidro fumado com a capacidade de 100 ml para diminuir a influência da luz.

Foram colocados 40 indivíduos por frasco, de modo a economizar o tempo e diminuir o número total de frascos facilitando assim, o seu transporte da EBM para o laboratório do Departamento de Ciências Biológicas, à concentração de 4% de formol.

Cada espécie teve o mesmo tratamento para os três tamanhos diferentes. Para a escolha das classes teve-se em conta dois critérios, sendo o principal a obtenção de 960 indivíduos de cada espécie, de modo a ter um total de 8 frascos por cada classe de tamanho contendo 40 indivíduos cada frasco desta forma, e o segundo critério foi de, tentar ter uma distância entre os tamanhos das classes de forma a poder visualizar melhor a reacção dos diferentes tamanhos ao formol.

Dos 8 frascos de cada classe de tamanho das três espécies, apenas se usaram 3 para cada tamanho das espécies *Dotila fenestrata* e *Idanthyrsus pennatus* respectivamente, e para a

espécie *Donax faba* usaram-se 4 frascos correspondendo aos 7, 30, 60, e 90 dias de conservação.

Este estudo foi feito apenas parcialmente devido à greve dos estudantes universitários tendo assim impossibilitado a obtenção dos resultados após 90 dias de conservação para as espécies *D. fenestrata* e *I. pennatus*, bem como a análise estatística dos dados obtidos aos 90 dias de conservação da espécie *D. faba* em formol.

Os restantes frascos serão para um estudo posterior que não será feito pela estudante.

As classes de tamanho por espécie, são apresentadas na tabela 1.

Tabela 1: Classes de tamanhos por espécie (mm)

Espécie:	<i>Donax faba</i>	<i>Dotila fenestrata</i>	<i>Idanntyrsus pennatus</i>
Classe 1	18	8	10
Classe 2	20	10	20
Classe 3	22	11	30

b) No laboratório do Departamento de Ciências Biológicas

Os organismos foram colocados na estufa durante 72 horas que já estava à temperatura de 70°C (Wimberg, 1971). Para as espécies *Dotila fenestrata* e *Donax faba* foram quebradas a carapaça e a concha respectivamente para facilitar a evaporação da água.

Este processo foi feito num almofariz e passado por água destilada para recolher inteiramente o exemplar de cada espécie para um cadinho. Depois da estufa, colocaram-se os cadinhos com o seu conteúdo em dessecadores durante cerca de 10 minutos no laboratório à temperatura ambiente de forma a permitir o seu arrefecimento sem adquirirem humidade. Em seguida, pesaram-se individualmente os organismos numa balança analítica com a precisão de 0,001 gramas e deste modo obteve-se o peso seco incluindo o peso do cadinho para cada organismo por classe de tamanho das diferentes espécies.

Depois deste processo os organismos ainda nos cadinhos foram colocados na mufla (que já estava à temperatura de 550°C) durante 2 horas ficando em cinza, ao fim desse tempo, os cadinhos e o seu respectivo conteúdo foram colocados em dessecadores durante cerca de 15 minutos à temperatura ambiente do laboratório a fim de arrefecerem sem

adquirirem humidade, pesando-se em seguida na balança analítica com a precisão de 0,001 gramas as cinzas juntamente com os respectivos cadinhos.

Após pesadas as cinzas com os respectivos cadinhos, deitou-se as cinzas fora limpando-se rapidamente o cadinho e pesando-se em seguida.

Para a obtenção do peso seco de cada organismo subtraiu-se ao valor anterior, o peso do cadinho respectivo

Para a obtenção do peso das cinzas de cada exemplar subtraiu-se o peso dos cadinhos. A biomassa orgânica foi calculada através da diferença entre o peso seco e o peso obtido depois da mufla (peso das cinzas).

Procedeu-se de forma semelhante com as Polichaeta (*Idanthyrsus pennatus*), Crustacea (*Dotila fenestrata*) e Bivalves (*Donax faba*) dos diferentes grupos de tamanho e de tratamento (7,30,60 e 90 dias respectivamente) de conservação em formol.

Os 7 dias representam o controle deste estudo, pois foi a medição inicial possível, visto que se necessitava de material do laboratório do Departamento de Ciências Biológicas.

O factor de correcção (Fc) foi calculado da seguinte forma:

$$Fct = 1 + \frac{P_0 - P_t}{P_t}$$

Onde:

Fct - Factor de correcção num determinado tempo t

P₀ - Peso inicial da espécie

P_t - Peso da espécie num dado tempo t

V. Material necessário

- Bisturi
- Borax (borato de sodio) a 3%
- Formol a 4%
- Dissecador
- Frascos de vidro fumado
- Marcador
- Pá
- Craveiras graduadas com precisão de 1 mm

- Balança analítica com precisão de 0,001 gramas modelo FX-300, marca:AND
- Estufa tipo M40 marca: Heraeus
- Mufla tipo 2 Modelo Tactial 308 marca: Gallenkamp
- Cadinhos de porcelana
- Papel de filtro
- Placas de petri
- Pinças
- Bandeja
- Papel vegetal
- Lápis de carvão
- Etiquetas
- Máscara de protecção
- Luvas de borracha

VI. Análise de dados

A análise dos resultados foi feita no programa Lotus 123 numa tabela com os seguintes itens:

- Espécie
- Classe de tamanho (por espécie)
- Tempo de conservação em formol (0, 30, 60 e 90 dias)
- Peso seco
- Cinzas
- AFDW (peso seco sem cinzas)

Foi usado o método Two-Way ANOVA para a análise da variância relativamente ao tempo de conservação no formol, entre os diferentes grupos de tamanho de indivíduos da mesma espécie e dois testes de Múltipla Comparação (Teste de LSD -" Least Significant Difference " e Teste de Duncan) para analisar em que grupos de tamanhos é que existiam as diferenças de AFDW e em que tempo de conservação (Wonnacott e Wonnacott, 1990).

VII. Resultados

A análise de variância através do teste ANOVA, feita às variáveis, tempo e tamanho, por cada espécie e para os 7, 30, 60, dias e aos 90 (parcialmente)

de conservação em formol, está apresentada na tabela 2 e observa-se que as espécies *Donax faba* e *Dotila fenestrata* são afectadas ao longo do tempo de conservação, pois os valores são significativos visto que ($P < 0.05$). A espécie *Idannthysus pennatus* só tem valores significativos relativamente aos tamanhos (i.e. o formol apenas afecta nos tamanhos desta espécie) não sendo afectada pelo tempo de conservação.

Relativamente à interacção entre o tempo e o tamanho, pode-se observar que apenas existe na espécie *Donax faba* ($P < 0.001$) e não existe em *Dotila fenestrata* e em *Idannthysus pennatus* (os valores não são significativos).

Tabela 2 : Análise de variância (Anova) para variáveis, tempo e tamanho de cada uma das três espécies abaixo.

Espécie	Efeito do tamanho			Efeito do Tempo		Interacção Tempo/Tamanho		
	G.L	F	P	F	P	G.L.	F	P
<i>D.faba</i>	4.2	195.44	<0.001	22.37	<0.001	4.4	5.997	<0.001
<i>D.fenestrata</i>	4.2	266.88	<0.001	8.445	<0.001	4.4	2.197	N.S
<i>I.pennatus</i>	4.2	123.12	<0.001	2.585	N.S.	4.4	0.727	N.S

N.S= Não é significativo.

Diferenças em relação ao tamanho

Foram feitos dois testes de comparação, o teste de LSD e o teste de Duncan e ambos foram unânimes nos seus resultados, pelo que será apresentado apenas o teste de LSD na tabela 3. Pode-se observar que os tamanhos diferentes têm diferentes respostas em relação à sua conservação em formol, apenas a espécie *Dotila fenestrata* mostrou que os tamanhos 10 e 11 mm são iguais (i.e. têm uma resposta idêntica ao formol) o que se pode justificar pela proximidade dos seus tamanhos.

Tabela 3: Diferenças entre os tamanhos das três espécies analisadas pelo teste de LSD.

ESPÉCIE	TAMANHO (mm)	TESTE DE LSD
<i>Donax faba</i>	18	A
<i>Donax faba</i>	20	B
<i>Donax faba</i>	22	C
<i>Dotila fenestrata</i>	8	A
<i>Dotila fenestrata</i>	10	B
<i>Dotila fenestrata</i>	11	B
<i>I. pennatus</i>	10	A
<i>I. pennatus</i>	20	B
<i>I. pennatus</i>	30	C

Diferenças em relação ao tempo

O teste de múltipla comparação em relação ao tempo de conservação (tabela 4) foi feito apenas para as espécies *Donax faba* e *Dotila fenestrata* uma vez que para o caso da espécie *Idanthyrsus pennatus* a análise de variância feita pelo teste Anova indicou que a mesma não era influenciada pelo tempo ($P > 0.005$).

Tabela 4: Diferenças entre os grupos de *D. faba* e *D. fenestrata* em relação ao tempo.

Espécie	Tempo (dias)	Teste de LSD
<i>D.faba</i>	7	A
<i>D.faba</i>	30	B
<i>D.faba</i>	60	B
<i>D.fenestrata</i>	7	A
<i>D.fenestrata</i>	30	B
<i>D.fenestrata</i>	60	B

A tabela 5 apresenta os valores médios de AFDW referentes às espécies *Donax faba* e *Dotila fenestrata* aos 7, 30, e 60 dias de conservação, a espécie *Idanthyrsus pennatus* não consta nesta tabela visto que não é influenciada pelo tempo e pretende-se analisar as diferentes respostas das espécies relativamente ao tempo de conservação.

Tabela 5: Relação entre as espécies da perda de AFDW médio e o tempo de conservação.

Espécie	Tempo(dias)	AFDW méd.	D.P	n=40	
				Minimo	Máximo
<i>D.faba</i>	7	0.069573	0.01094	0.058633	0.080513
<i>D.faba</i>	30	0.065296	0.014919	0.050377	0.080215
<i>D.faba</i>	60	0.05975	0.019372	0.040378	0.079122
<i>D.faba</i>	90	0.057783	0.016665	0.041118	0.074448
<i>D.fenestrata</i>	7	0.074992	0.014917	0.060075	0.089909
<i>D.fenestrata</i>	30	0.070225	0.019806	0.050419	0.090031
<i>D.fenestrata</i>	60	0.068465	0.019141	0.049324	0.087606

Foi feita a análise de regressão para cada classe e tamanho por espécie em relação ao tempo de conservação no formol, e pode-se observar na tabela 6 que a espécie *Donax faba* é influenciada por este conservante apenas nos tamanhos de 18 e 20 mm ($P < 0.001$). As de 22 mm não são afectadas pelo mesmo, pois os seus valores não são significativos.

Tabela 6: Análise de regressão das diferentes classes de tamanho por espécie.

Espécie	Tamanho (mm)	Valor de a	Valor de b	G.L.	F	P	R ²
<i>D.faba</i>	18	-0.0097	0.058	1.118	46.66	<0.001	0.28
<i>D.faba</i>	20	-0.0049	0.072	1.118	12.32	<0.001	0.95
<i>D.faba</i>	22	-0.00064	0.079	1.118	0.341	N S	0.0029
<i>D. fenestrata</i>	8	-0.0056	0.056	1.118	13.691	<0.001	0.104
<i>D. fenestrata</i>	10	-0.002	0.082	1.118	2.239	N S	0.186
<i>D. fenestrata</i>	11	-0.0011	0.084	1.118	0.8763	N S	0.0074
<i>I. pennatus</i>	10	-0.00086	0.032	1.118	0.6197	N S	0.0052
<i>I. pennatus</i>	20	-0.0021	0.059	1.118	1.2056	N S	0.001
<i>I. pennatus</i>	30	-0.005	0.072	1.118	3.2385	N S	0.027

Na tabela 7 está apresentada a análise de regressão linear que foi feita às três espécies. Esta mostra que apenas a espécie *Donax faba* é influenciada pelo conservante ($P < 0,001$), as espécies *D. fenestrata* e *I. pennatus* não são influenciadas (os valores de P não são significativos) embora haja uma tendência negativa para todas elas; pode-se observar através dos coeficientes de "a" que a regressão é negativa.

Tabela 7: Análise de regressão linear das 3 espécies em estudo.

Espécies	Valor de a	Valor de b	G.L.	F	P	R ²
<i>D. faba</i>	-0.005096	0.069968	1.358	20.911	<0.001	0.5519
<i>D. fenestrata</i>	-0.02917	0.074231	1.358	5.6009	N.S	0.0154
<i>I. pennatus</i>	-0.002654	0.054179	1.358	2.9904	N.S	0.00828

N.S = Não é significativo.

Ainda através da regressão testou-se os intervalos de confiança do coeficiente de "a" o que se pode observar através da tabela 8, podendo assim verificar se realmente são os

individuos de menor tamanho os que perdem mais peso através da inclinação do ângulo "a" ou seja valor de "a".

Tabela 8: Análise de regressão linear das classes de tamanho das espécies em estudo.

Espécies	Tamanho (mm)	Valor de "a"	I.C Inferior	I.C Superior	P
<i>D. faba</i>	18	-0.0097	-0.01256	-0.00692	<0.001
<i>D. faba</i>	20	-0.0049	-0.0076	-0.002141	<0.001
<i>D. faba</i>	22	-0.0006	-0.0028	-0.001524	N.S
<i>D. fenestrata</i>	8	-0.005637	-0.00865	-0.00262	<0.001
<i>D. fenestrata</i>	10	-0.002037	-0.004734	0.000659	N.S
<i>D. fenestrata</i>	11	-0.001075	-0.003349	0.001199	N.S
<i>I. pennatus</i>	10	-0.00086	-0.003032	0.01307	N.S
<i>I. pennatus</i>	20	-0.002075	-0.005817	0.001667	N.S
<i>I. pennatus</i>	30	-0.005025	-0.010555	0.000504	N.S

N.S= Não é significativo.

Os resultados de AFDW médios obtidos por classe das três espécies durante esta experiência, são apresentados nos gráficos 1, 2 e 3 referentes às espécies *Donax faba*, *Dotila fenestrata*, e *Idanthyrsus pennatus* respectivamente.

Para a espécie *Donax faba*, nos tamanhos 20 e 22 mm os valores de AFDW médios, são diferentes na sua reacção ao formol, o que se observa através do teste de diferença (LSD) dos 7 aos 60 dias, vindo a ter uma diminuição do AFDW o durante os 60 a 90 dias o que se verifica através do cálculo da percentagem de perda de AFDW. Observa-se também através do teste LSD, que para o tamanho de 18 mm o valor médio de AFDW é menor aos 7 dias relativamente aos outros dois tamanhos, e dos 7 aos 60 dias, não havendo diferenças entre os 60 a 90 dias.

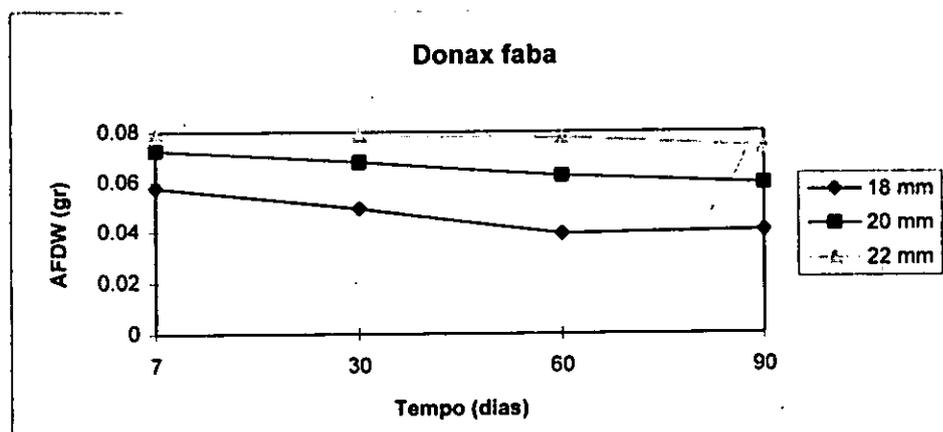


Figura 1: Variação da AFDW da espécie *D. faba* em diferentes tempos de conservação em formol a 4%

A espécie *Dotila fenestrata*, (na figura 2) mostra aos 7 dias um menor AFDW médio para o tamanho de 8 mm relativamente aos tamanhos de 10 e 11 mm. Estes últimos mostram um mesmo AFDW médio neste período o que se verifica através do teste de LSD. Após os 30 e 60 dias de conservação mostram uma resposta idêntica ao preservante. Há uma diminuição para os indivíduos de 8 e 10 mm, mantendo-se dos 30 aos 60 dias. Os tamanhos de 11 mm mostram não ser influenciados pelo mesmo os valores de P não são significativos).

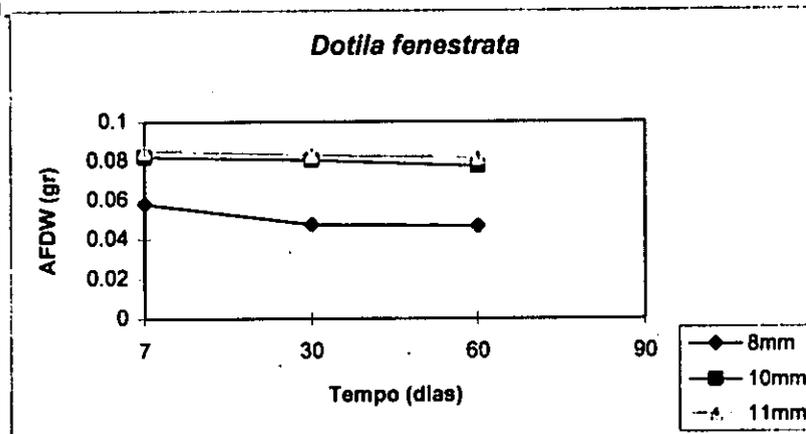


Figura 2 : Variação da AFDW média da espécie *D. fenestrata*

Para espécie *Idanthyrus pennatus*, (na figura 3) não é influenciada (P não é significativo), embora haja uma tendência negativa à conservação ("a negativo).

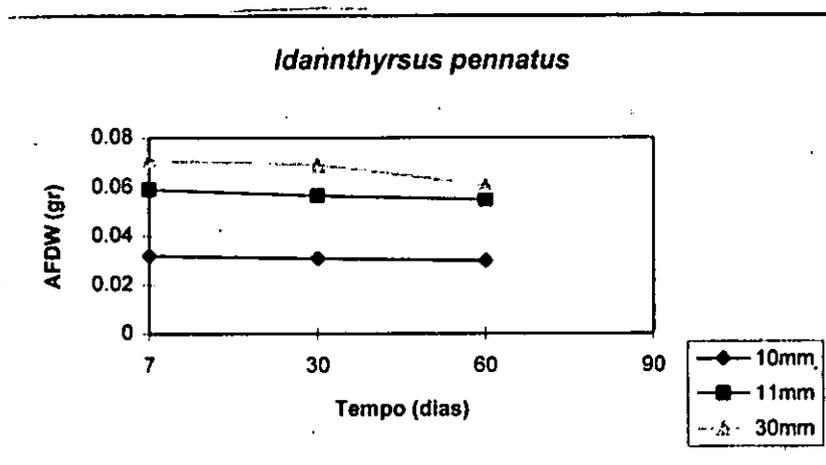


Figura 3: Variação da AFDW média da espécie *I. pennatus*.

As tabelas 9, 10 e 11 mostram a relação de perda percentual das espécies *D. faba*, *D. fenestrata* e *I. pennatus* respectivamente, após 30 e 60 dias de conservação. Os gráficos das figuras 4, 5 e 6 ilustram melhor a perda percentual de AFDW médio.

Tabela 9: Relação da % de perda da de AFDW da espécie *Donax faba*

Espécie	Tamanho (mm)	7-30 dias	7-60 dias
<i>D.faba</i>	18	14.3341	31.9367
<i>D.faba</i>	20	6.221915	13.5845
<i>D.faba</i>	22	0.109	0.9838

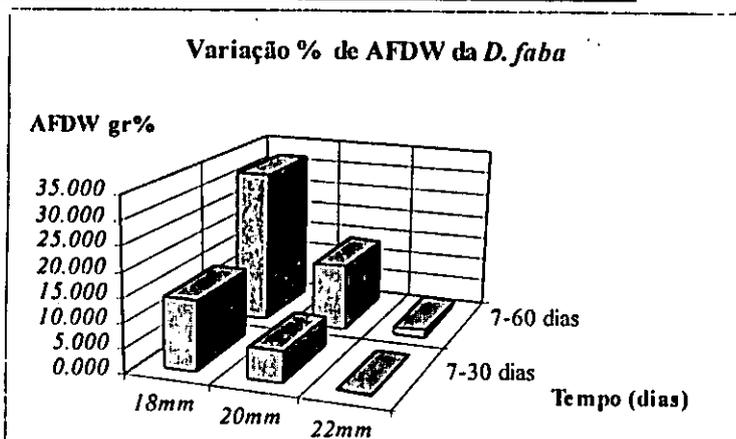


Figura 4: Perda percentual de AFDW da espécie *D. faba*.

Tabela 10: Relação da % de perda de AFDW da espécie *Dotila fenestrata*

Espécie	Tamanho (mm)	7-30 dias	7-60 dias
<i>D. fenestrata</i>	8	18.064	19.6197
<i>D. fenestrata</i>	10	2.0706	5.82217
<i>D. fenestrata</i>	11	2.528668	4.05763

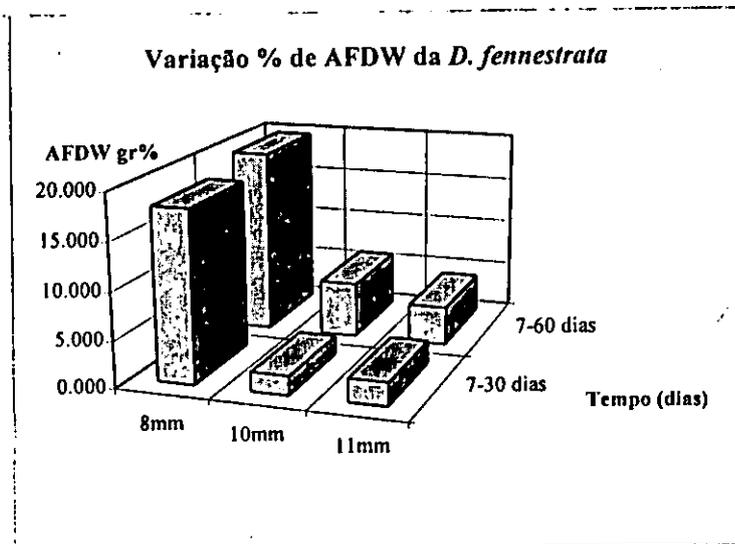


Figura 5: Perda percentual de AFDW da espécie *D. fenestrata*.

Tabela 11: Relação da % de perda de AFDW da espécie *Idanthyrsus pennatus*

Espécie	Tamanho (mm)	7-30 dias	7-60 dias
<i>I. pennatus</i>	10	3.8963	6.52003
<i>I. pennatus</i>	20	4.35702	7.02199
<i>I. pennatus</i>	30	2.4364	14.1949

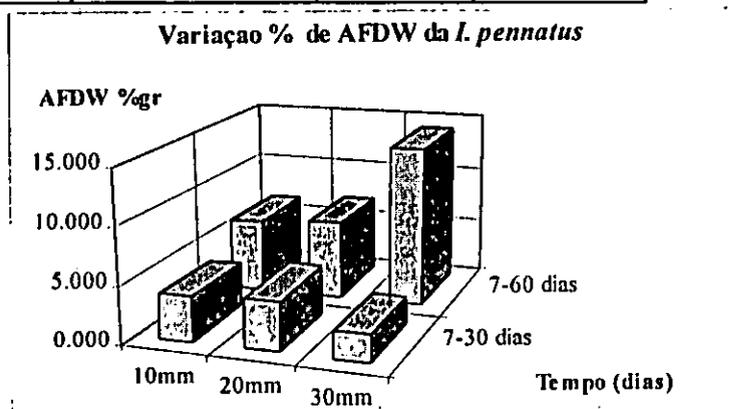


Figura 6: Perda percentual de AFDW da espécie *I. pennatus*.

A tabela 12 mostra a relação percentual de perda de AFDW entre as espécies e quanto à espécie *Donax faba* observa-se que aumenta bastante, com o tempo de conservação em formol. Isto pode ser melhor visualizado através do gráfico da figura 7.

Tabela 12: Relação da % de perda de AFDW das espécies em estudo.

Espécie	% DE PERDA DE AFDW	
	7-30 dias	7-60 dias
<i>D. faba</i>	6.15	14.12
<i>D. fenestrata</i>	6.85	7.53
<i>I. pennatus</i>	3.41	9.85

A figura 7 abaixo permite melhor visualização da perda percentual de AFDW das espécies em estudo após os 30 e 60 dias de conservação.

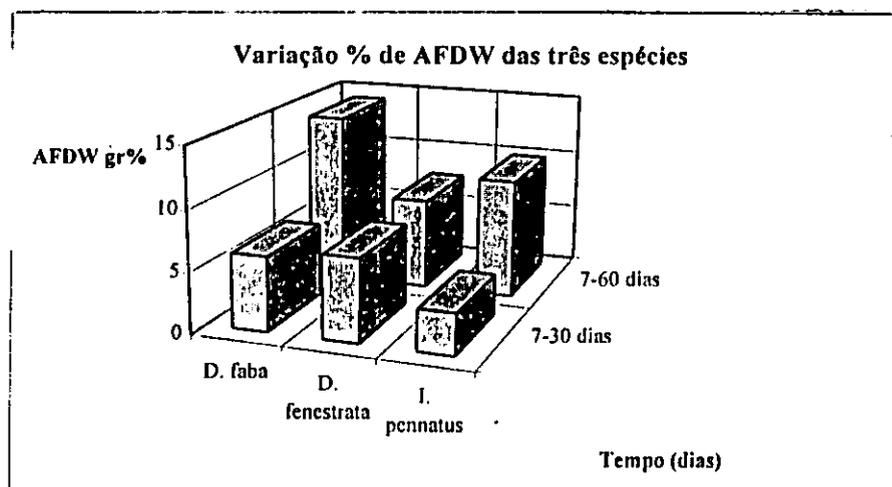


Figura 7: Relação percentual de AFDW das espécies em estudo.

A tabela 13 representa a aplicação da fórmula do factor de correcção a partir da qual se pode calcular o peso inicial de um organismo (i.e. estimar o peso de um organismo no tempo anterior à sua conservação) após conservado por um determinado tempo conhecido.

Espécie	Fc-30	Fc-60
<i>D. faba</i>	1.053658	1.1514644
<i>D. fenestrata</i>	1.079774	1.0929398
<i>I. pennatus</i>	1.03554701	1.0354701

VIII. Discussão

Através da análise de variância Two-way (ANOVA), pode-se verificar (tabela 2), que o formol influencia as espécies de acordo com o seu tamanho ($P < 0,001$).

Segundo Howmiller (1972), citado em Mills *et al.* (1982), que fez um estudo e detectou diferenças entre os pesos de nematodos, estas poderiam dever-se ao tempo de preservação dos organismos, à composição do preservante e talvez, à razão entre a massa do tecido do animal e o seu volume. Esta última possibilidade vai de encontro à segunda hipótese deste estudo "quanto maior fôr o tamanho dos organismos bentónicos, conservados em formol, menor será a perda relativa do seu material orgânico", que poderá ser comprovada através do teste de comparação entre as classes de tamanhos das diferentes espécies (Teste de LSD) que apresenta uma resposta diferente ao conservante dentro de cada espécie.

A exceção verificada entre os tamanhos 10 e 11 mm da espécie *D. fenestrata* poderá dever-se ao facto de os seus tamanhos serem muito próximos (apenas 1 mm de diferença), tendo então a mesma reacção ao conservante.

Relativamente ao tempo de conservação das respectivas espécies em formol a 4% (Tabela 3), verificou-se que este factor influencia as espécies *D. faba* e *D. fenestrata* ($P < 0.001$), exceptuando-se a espécie *Idanthyrus pennatus* que apresentou valores não significativos. Uma razão para a espécie *I. pennatus* não ter sido influenciada pelo tempo poderá ser o facto de esta análise ter começado após 7 dias de conservação em formol, podendo ter perdido todo o seu AFDW, de acordo com Mills *et al.* (1982), as mudanças rápidas no conteúdo de água no organismo, são as principais responsáveis pelas variações bruscas de peso que podem ocorrer após alguns minutos a uns dias de conservação em formol, particularmente em invertebrados marinhos de corpo mole.

A tabela 4, mostra que no tempo inicial (7 dias) os organismos têm uma resposta diferente à que se verifica medidos os seus AFDW após 30 e 60 dias de conservação, mostrando assim que apresentam uma maior perda de AFDW no início e que depois tendem a estabilizar essa perda uma vez que são iguais aos 30 e 60 dias de conservação. Esta tendência de estabilização de peso foi analisada por Lebedeva e Kozlova (1969), citadas em Schram *et al.* (1981), descobriram que a perda de peso na *Daphnia pulex* estabiliza após 10 dias em formol a 4%.

Schram *et al.* (1981), fez um estudo com um crustáceo para medir a perda de peso seco quando preservado em formol a 3%, e o tempo que leva a estabilizar, afirmou que havia uma perda de 25 a 47% do seu peso seco após 15 e 47 dias de preservação respectivamente e que aos 65 dias as espécimens exibiam um aparente ganho de peso que poderia ocorrer devido a dificuldades técnicas associadas ao manuseamento de espécimens tão pequenas, assim como também poderia ser explicado pelo complexo entre o formol e as moléculas proteicas. Ele concluiu que ocorrem variações durante a estabilização do peso.

Quanto a este fenómeno de estabilização do peso dos organismos após algum tempo de conservação há várias opiniões divergentes. Por um lado Howmiller (1972), citado em Mills *et al.* (1982), o efeito do peso tende a estabilizar após cerca de um mês de preservação, por outro Mills *et al.* (1982), afirma que soluções de formaldeído em água do mar devem reduzir com a mudança do peso inicial (i.e. alterações de peso ocorrem após poucos minutos de preservação) e que é pouco provável que hajam alterações significativas depois de longos períodos de tempo.

Na análise de regressão (Tabela 6), feita a cada classe de tamanho de cada espécie, mostrou que as classes de 18 e 20 mm são afectadas pela conservação em formol e a de 22 mm não é afectada, isto pode-se dever ao facto desta última classe por ser relativamente grande comparativamente às outras duas da mesma espécie, ainda não tenha sido significativamente afectada até ao momento. Pode-se dever também ao facto da sua concha ser mais resistente à dissolução do formol, pois segundo Widbom, (1984) que fez um estudo sobre a média individual do peso seco e da biomassa da meiofauna marinha incluindo organismos como nematodos, bivalves e polichaetas e descobriu que a média de perda de AFDW da maior parte dos organismos era de 80 a 90% excepto as espécies com conchas calcárias como as ostras (46 a 50%) e os bivalves juvenis (75%).

Na espécie *Dotila fenestrata* apenas a classe de 8 mm é afectada pelo conservante e a espécie *Idanthyrsus pennatus* não é afectada quando separada por classes de tamanhos, isto pode dever-se ao facto de a sua perda de AFDW quando considerada individualmente embora tenha uma tendência negativa (valor de "a" negativo) , de acordo com Widbom (1984), a média individual da biomassa de diferentes taxa da meiofauna é influenciada pela composição das espécies, pela idade e pelo tamanho da estrutura da população.

O gráfico da figura 7 mostra que a espécie *D. faba* foi a que perdeu mais AFDW, isto pode-se dever a uma possível dissolução de materiais constituintes da concha destes organismos devido a um possível erro aquando da adição do borax ao formol como tampão, este facto é levantado por Widbom (1984) que afirma ser muito importante usar o formol bem tamponado, pois pode resultar na diminuição do peso de bivalves e ostras através da dissolução dos carbonatos das conchas calcárias.

IX. CONCLUSÕES:

1. Quanto maior fôr o tempo de conservação em formol, maior é a perda de biomassa dos organismos em estudo, ($P < 0.005$).

2. Quanto maior fôr o tamanho dos organismos da espécie *Donax faba* menor será a perda relativa do seu material orgânico, (o grupo de 18 mm tem uma resposta diferente dos de 20 e 22 mm e estes últimos são iguais).

3. A espécie *Donax faba* é a mais influenciada em relação ao tempo, ao tamanho e na interação tempo/tamanho, relativamente às outras duas analisadas neste estudo, Two-way ANOVA ($P < 0,005$).

X. RECOMENDAÇÕES:

- 1- Tentar fazer este trabalho usando as duas concentrações de 4 e 10% de formol
- 2- Tentar obter uma maior diferença nos tamanhos dos indivíduos dentro de cada espécie, de modo a obter uma melhor comparação das diferentes respostas destes ao conservante.
- 3- Tentar realizar a experiência exacta no tempo zero (isto é, colocar os organismos em formol no campo), medir o seu comprimento e colocá-los imediatamente na estufa.
- 4- Continuar o estudo por mais tempo para observar melhor a influência do formol sobre o peso seco e sobre o AFDW destas ou de outras espécies.

XI . Referências Bibliográficas

Afonso A. (em preparação). Estudo de Três Géneros de Caranguejos no Saco Da Inhaca.

Alcorno E. (1990). Fundamentals of Microbiology. Third edition, 960 pp. Redwood City, The Benjamin/Cummings Publishing Company Inc.

Birkett, I. e A. D. McIntyre (1971). Treatment and Sorting of Samples. In: Holme, N.A.; A.D.McIntyre. (editors). Methods for the Study of Marine Benthos. First Edition. 157-168 pp. Oxford, Blackwell Scientific Publications.

Freitas S. (1993). Estrutura das Comunidades Bentónicas do Mangal da Ilha da Inhaca (Moçambique). Tese de Licenciatura. 33 pp. Lisboa, Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa.

Gage, J. D. e P. A. Tyler (1992). Deep Sea Biology, a Natural History of Organisms at the Deep Sea Floor. 504 pp. Cambridge, Cambridge University Press.

Ivell, R. (1983). The Preparation of Molluscan Tissue for Production Estimates, 49: 18-20.

Kalk, M. (1995). A Natural History of Inhaca Island, Mozambique. Third edition, 395 pp. Cape Town, Witwatersrand University Press.

Lappalainen, A. e P. Kangas (1974). Littoral Benthos of the Northern Baltic Sea II. Interrelationships of Wet, Dry and Ash - Free Dry Weights of Macrofauna in the Tvarminne Area. Int. Revue ges. Hydrobiol., 60: 297-312.

Longamane, F. (1995). Exploração das Áreas Entre Marés pela População Humana no Saco da Ilha da Inhaca. Tese de Licenciatura. 57 pp. Maputo, Universidade Eduardo Mondlane.

Macnae & M. Kalk (1969). A Natural History of Inhaca Island. Revised Edition. 163 pp. Johannesburg. University of Witwatersrand.

Mills, E. L., K. Pittman e B. Munroe (1982). Effect of Preservation on the Weight of Marine Benthic Invertebrates. Can J. Fish. Aquat. Sci., 39: 221-224.

Parsons, T. R., Y. Maita, C. M. Lalli (1984). A Manual of Chemical and Biological Methods for Seawater Analysis. First edition. Oxford, Pergamon Press. Schram, M. D., G. R. Ploskey e E. H. Schmitz (1981). Dry Weight Loss in *Ceriodaphnia lacustris* (crustacea, Cladocera) Following Formalin Preservation. Trans. Amer. Micros. Soc., 100 (3): 326-329.

Wickstead, J. H. (1966). An Introduction to the Study of Tropical Plancton. First edition, 160 pp. London, Hutchinson and Co Ltda.

Widbom B. (1984). Determination of Average Individual Dry Weight and Ash-Free Dry Weights in Different Sieve Fractions of Marine Meiofauna. Marine Biology. 84: 101-108.

Wimberg, G. G. (1971). Methods for the Estimation of Production of Aquatic Animals. 175 pp . London, Academic Press.

Wolf, W. J., A. G. Duiven, P. Duiven, P. Esselink, A. Gueye, A. Meijboom, G. Moerland e J. Zegers (1993). Biomass of Macrobenthic Flat of the Banc d'Arguin, Mauritania. Hydrobiologia. 258: 151-163.

Wonnacott, T. H. e R. J. Wonnacot (1990). Introductory Statistics. Fifth Edition, 771 pp. Singapore.

ANEXO 1

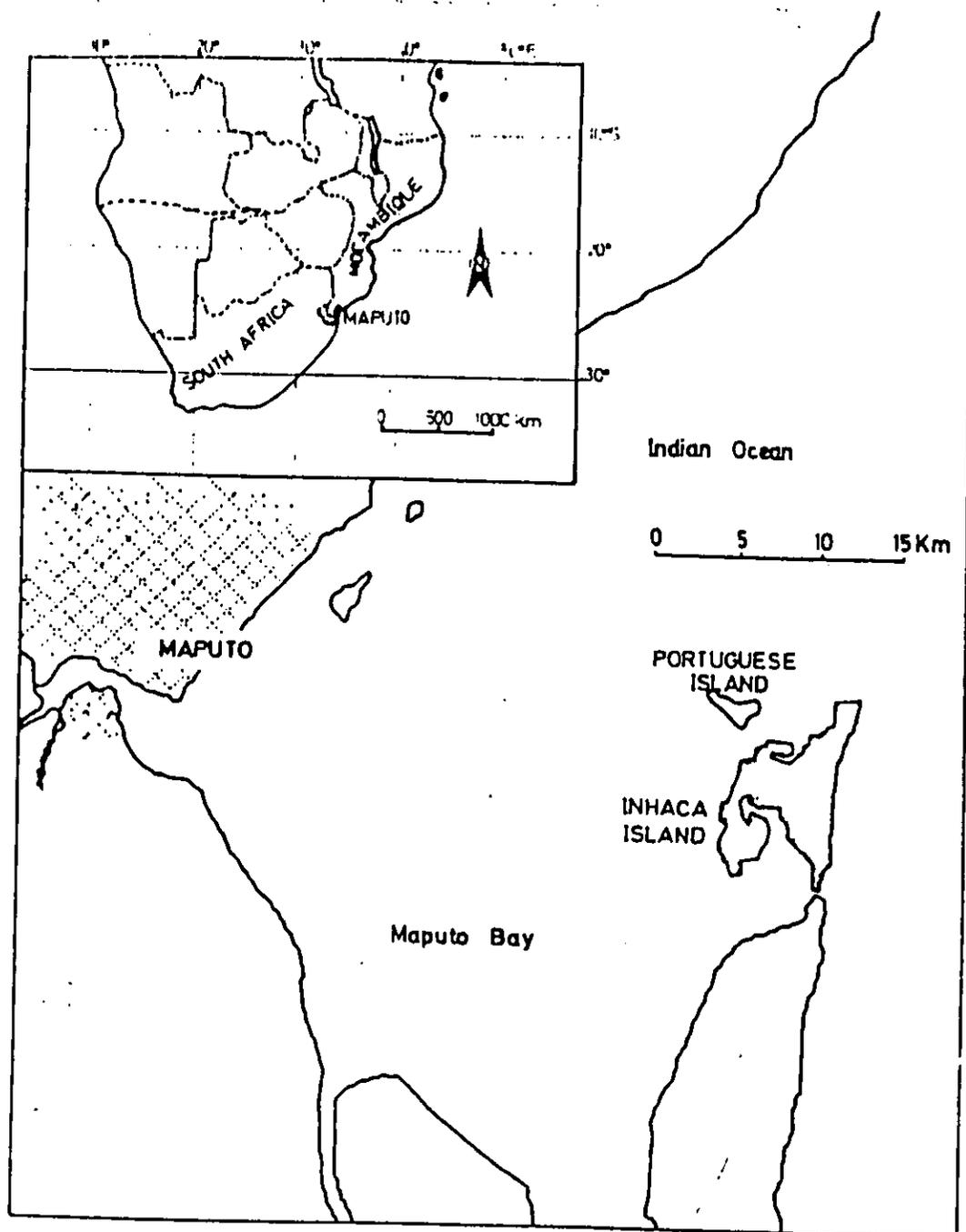
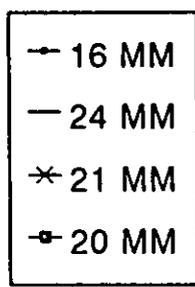
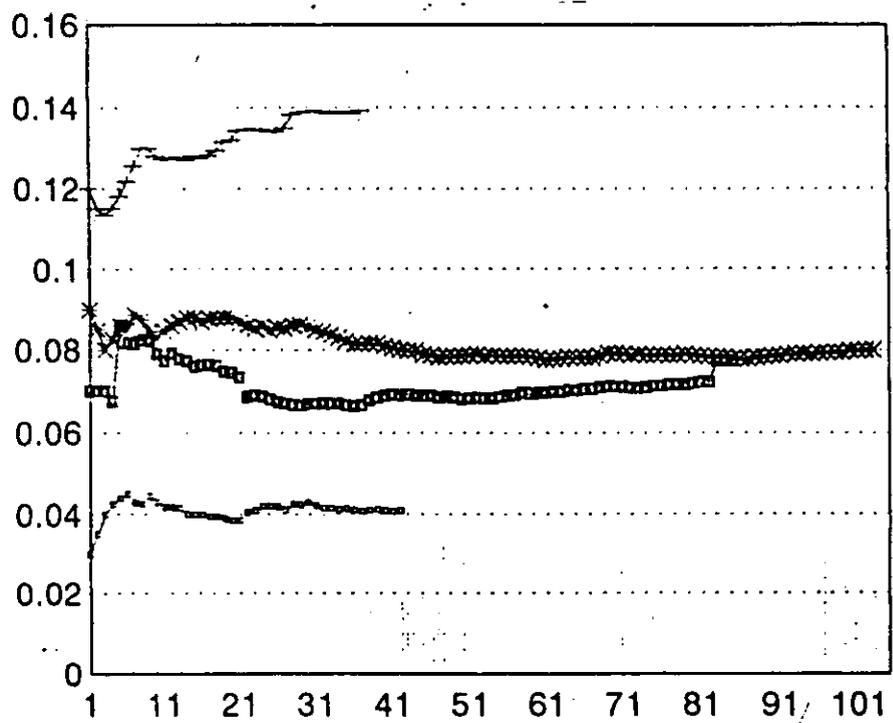
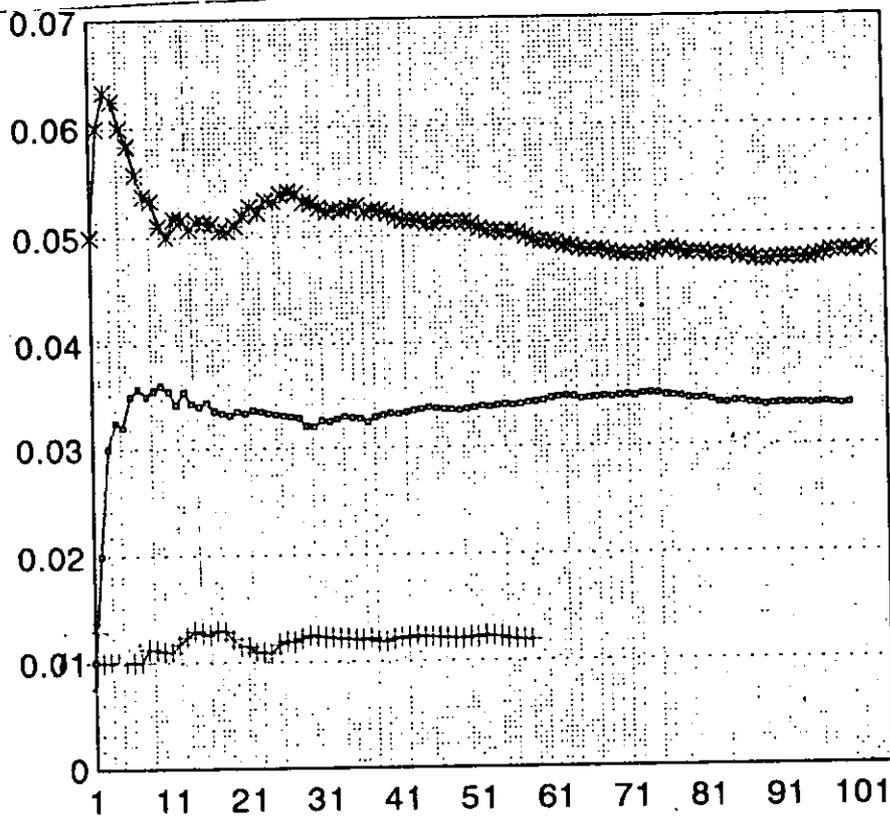


Figura 1. Localização geográfica da Ilha da Inhaca. O quadro inserido mostra a sua localização na África Austral (Hatton e Couto, 1992)

ANEXO2 *Donax faba*





Series 1
7mm
Series 2
5mm
Series 3
8mm