



Universidade dos Açores

Departamento de Oceanografia e Pescas

Relatório de estágio da Licenciatura em Biologia Marinha

Aspectos da Biologia e Ecologia de *Pachycara
thermophilum* Geistdoerfer, 1994 (Pisces: Zoarcidae)

Nuno Miguel Pires da Costa

Orientadores: Doutor Filipe M. Porteiro
Doutora Ana Colaço

Horta, Dezembro de 2008

Índice

Resumo	1
1. Introdução	2
1.1. Conhecimento actual sobre <i>Pachycara thermophilum</i>	3
1.1.1. Descrição morfológica.....	4
1.1.2. Ecologia e habitat.....	4
1.2. Ecossistemas hidrotermais	5
1.3. Objectivos	6
2. Material e métodos	7
2.1. Recolha da amostra.....	7
2.2. Descrição do habitat e do comportamento	8
2.3. Amostragem biológica	8
2.4. Morfometria e merística	8
2.5. Leitura dos otólitos.....	9
2.6. Ecologia trófica	9
2.7. Concentração de mercúrio (Hg).....	10
2.8. Histologia das gónadas.....	11
3. Resultados	12
3.1. Descrição do habitat e comportamento	12
3.1.1. Snake Pit.....	12
3.1.2. Logatchev.....	13
3.1.3. Broken Spur	14
3.2. Abundância e densidade de <i>P. thermophilum</i>	15
3.3. Comportamento	16
3.4. Amostragem biológica	16
3.5. Morfometria e merística	17
3.6. Idade.....	20
3.7. Ecologia trófica	22
3.8. Concentração de mercúrio (Hg).....	22
3.9. Biologia reprodutiva	23
4. Discussão.....	26
4.1. Comportamento e ecologia.....	26
4.2. Amostragem biológica	26
4.3. Morfometria e merística	27
4.4. Idade.....	28
4.5. Concentração de mercúrio (Hg).....	29
4.6. Biologia reprodutiva	30
5. Conclusões.....	31
6. Agradecimentos	32
7. Referências bibliográficas	33
ANEXO I.....	36
ANEXO II	37
ANEXO III.....	38
ANEXO IV	39
ANEXO V	41
ANEXO VI	43

Resumo

A espécie *Pachycara thermophilum* foi originalmente descrita com base em espécimes capturados no campo hidrotermal Snake Pit da Dorsal Medio-Atlântica. A descrição do habitat em que se insere *P. thermophilum* é feita com base em vídeos capturados pelo submersível *Alvin* nos campos hidrotermais Snake Pit, Logatchev e Broken Spur, durante a campanha oceanográfica “DIVERSExpedition”. Neste trabalho, peixes desta espécie capturados no Snake Pit foram estudados, com o objectivo de comparar as suas características diagnosticantes com as características anteriormente descritas para a espécie. Para tal fez-se uma contagem dos traços merísticos e fizeram-se medições das diferentes partes do corpo. Os otólitos de cada espécime foram observados para determinação de idades. O indivíduo mais novo tinha três anos de idade e o mais velho tinha oito. Foram feitas análises da concentração de mercúrio (Hg) nos músculos e fígados de forma a relacioná-las com o meio tóxico em que se insere *P. thermophilum*. A análise das gónadas destes indivíduos revelou que as fêmeas se encontravam em fase de postura enquanto os machos se apresentavam na fase de repouso. Em dois indivíduos verificaram-se estruturas com dimensões muito superiores às dos oócitos o que presumivelmente poderão ser embriões em desenvolvimento. Estes dois factores parecem indicar que a fecundação é interna.

1. Introdução

Pachycara thermophilum Geistdoerfer, 1994 é um peixe batidemersal da família Zoarcidae, ordem Perciformes. O género *Pachycara* tem 21 espécies descritas que se distribuem nos oceanos Pacífico, Atlântico, Antártico e Índico (BISCOITO & ALMEIDA 2004). Ao contrário das outras espécies deste género, pensa-se que *P. thermophilum* vive estritamente em ecossistemas hidrotermais de profundidade, da Dorsal Médio-Atlântica (DMA) (Fig. 1) (FROESE & PAULY 2008).

O epíteto específico dado por P. Geistdoerfer para esta espécie, ilustra bem a afinidade que ela tem por estes ambientes quentes. O nome “thermophilum” deriva da palavra grega “thermos” que significa quente. Outros zoarcídeos, tais como *Pachycara gymninium*, *Pachycara rimae*, *Thermaces cerebrus*, *Thermaces pelophillum* e *Pyrolycus manusanus*, vivem também em campos hidrotermais, escorrências frias ou em outros ambientes quimiossintéticos, como cadáveres afundados de baleias (SANCHO *et al.* 2005; DESBRUYÈRES *et al.* 2006).

P. thermophilum foi descrito com base em indivíduos capturados no campo hidrotermal Snake Pit (23°22'N, 44°57'W, a 3480 m de profundidade). Posteriormente a espécie foi encontrada nos campos hidrotermais Logatchev (14°45'N, 44°58.7'W, 3000 m), Trans-Atlantic Geotraverse (TAG; 26°08'N, 44°49'W, 3600 m) e Broken Spur (29°10'N, 43°10.3'W, 3020 m) (BISCOITO & ALMEIDA 2004; STEFANNI *et al.* 2007; DESBRUYÈRES *et al.* 2006).

O peixe anguiliforme que vive na proximidade de áreas activas do campo hidrotermal Rainbow (36°13.10'N; 33°54.35'W; 2270–2320m), foi inicialmente identificado como *Lycenchelys* sp. Gill 1884. Mais tarde, BISCOITO & ALMEIDA (2004) descreveram *Pachycara saldanhai*, com base em 6 indivíduos capturados no em Rainbow, durante as campanhas PICO e SALDANHA. *P. saldanhai* apresentava grande afinidade com *P. thermophilum*, da qual difere por possuir uma linha lateral com dois ramos e um valor mais elevado da razão distância interorbital/comprimento da cabeça. Segundo os autores, *P. saldanhai* difere ainda de *P. thermophilum* por ter um número

superior de vértebras, bem como de raios das barbatanas dorsal e anal (BISCOITO & ALMEIDA 2004).

Mais tarde, e apesar das diferenças morfológicas descritas entre as duas espécies, STEFANNI *et al.* (2007) ao compararem geneticamente (mtDNA) espécimes capturados em Logatchev, Snake Pit e Rainbow, não encontraram entre eles diferenças significativas que suportassem o reconhecimento das duas espécies. Assim, os autores sugeriram que *P. Saldanhai* fosse sinonimizado com *P. thermophilum*. Desta forma, as diferenças morfológicas descritas por BISCOITO & ALMEIDA (2004) poderão ser consideradas expressões fenotípicas como resultado do grande distanciamento geográfico que separam os campos hidrotermais em estudo (STEFANNI *et al.* 2007).



Figura 1 – Os pontos vermelhos indicam a distribuição geográfica de *P. thermophilum* na DMA (OBIS 2008).

1.1. Conhecimento actual sobre *Pachycara thermophilum*

Pouco se sabe acerca da biologia e ecologia desta espécie. O conhecimento existente baseia-se em recolhas e observações pontuais feitas em exemplares recolhidos durante as campanhas oceanográficas que visitaram estes campos hidrotermais.

1.1.1. Descrição morfológica

P. thermophilum é um peixe comprido, anguiliforme, com boca grande e terminal. Os olhos azuis escuros de *P. thermophilum* são grandes, redondos, com um diâmetro entre 12,5 e 13% do comprimento da cabeça. As barbatanas dorsal (107 raios) e anal (86 raios), são confluentes com a caudal (8 raios). Apresentam barbatanas peitorais grandes, com 18 raios, inseridas a meio dos flancos posteriormente às fendas branquiais. As barbatanas pélvicas são diminutas e inserem-se ventralmente ao nível das fendas branquiais. O ânus situa-se imediatamente à frente da origem da barbatana anal. As escamas são pequenas, embutidas na pele. Apresenta uma única linha médio-lateral, pouco evidente, que começa em frente ao ângulo superior do opérculo. O número total de vértebras é entre 107 e 112. Até ao momento, o maior espécime de *P. thermophilum* capturado media 388 mm de comprimento total (FROESE & PAULY 2008). *P. thermophilum* apresenta cor castanha clara com excepção do ventre que é ligeiramente azulado. As barbatanas são cinzentas, excepto a barbatana caudal que não é pigmentada. O bordo das barbatanas é castanho escuro. As cavidades bucal e branquiais são brancas (GEISTDOERFER 1994; PARIN 1995).

1.1.2. Ecologia e habitat

P. thermophilum vive nas imediações de fontes hidrotermais activas, em águas com temperaturas entre 5 e 20°C. (GEISTDOERFER 1994; PARIN 1995; DESBRUYÈRES & SEGONZAC 1997).

Estes peixes são predadores (carnívoros) especializados, ocupando o topo da cadeia alimentar da comunidade associada ao hidrotermalismo (GEISTDOERFER 1994). Este autor identificou no estômago do holótipo, 24 camarões Alvinocarididae um pouco digeridos: 8 *R. exoculata*, 8 *C. chacei* juvenis e 8 camarões não identificados.

Este zoarcídeo apresenta um modo de natação anguiliforme, movimentando-se por ondulações rítmicas e laterais do corpo inteiro para propulsão (MOYLE & CECH 1996).

Os campos hidrotermais onde habita *P. thermophilum*, apresentam muitas semelhanças, no que diz respeito à fauna que neles se encontra. *P. thermophilum* é particularmente abundante no campo hidrotermal Snake Pit. Em todos estes campos hidrotermais o peixe partilha o biótopo com o camarão *Rimicaris exoculata*, que domina a biomassa nas chaminés de fumarolas negras, e com mexilhões *Bathymodiolus puteoserpentis* que dominam a biomassa nas bases de chaminés. A megafauna inclui ainda outros camarões (*Chorocaris chacei*, *Mirocaris fortunata*, e *Alvinocaris markensis*), um caranguejo (*Segonzacia mesatlantica*), uma galatea (*Munidopsis crassa*) e um ofiurídeo (*Ophioctenella acies*). Para além de *P. thermophilum* existem outros peixes como *Ilyophis saldanhai* (família Synaphobranchidae) e um Bythitidae não identificado que vive nos campos hidrotermais Snake Pit, Logatchev e Broken Spur (*Bythitidae* gen. sp.) (COPLEY *et al.* 1997; GEBRUK *et al.* 2000; COLAÇO 2001; TURNIPSEED *et al.* 2003; DESBRUYERES *et al.* 2006).

Michel Segonzac dissecou vários espécimes de *P. thermophilum* capturados nos campos hidrotermais Snake Pit e Logatchev para verificar a presença de parasitas. Foram encontrados nemátodes apenas nos intestinos (SEGONZAC *et al.* 2001).

1.2. Ecossistemas hidrotermais

O fenómeno hidrotermal, está indirectamente relacionado com a expansão do fundo marinho. No eixo das dorsais (expressões de processos de escala planetária de formação de crosta oceânica, separação de placas e de perda de calor global), quando o magma a 1200°C sobe para a superfície, consolida, originando a nova crosta que se vai fracturando. A água, por movimentos de convexão, circula por entre a nova rocha incandescente, aquecendo, e transportando gases e minerais na sua ascensão. O fluído quente é ejectado a velocidades superiores a 5 m/s e atinge temperaturas de 350°C. À medida que a água quente e rica em minerais flui para o exterior da crosta e se mistura com a água fria do oceano, precipita uma grande quantidade de minerais, o que torna a água da fonte hidrotermal negra ou branca (COLAÇO 2001).

Presentemente são conhecidas 7 fontes hidrotermais de profundidade na Dorsal Medio-Atlântica: o primeiro campo hidrotermal a ser descoberto foi Trans-Atlantic Geotraverse (TAG) em 1985. Nos anos seguintes foram descobertos os campos Snake Pit, seguido de Lucky Strike, Broken Spur, Menez Gwen, Logatchev, Rainbow em 1997, Saldanha em 1998 e o Lost City em 2000 (COLAÇO 2001; BISCOITO *et al.* 2006; KELLEY *et al.* 2007).

1.3. Objectivos

O objectivo central deste trabalho consiste em aprofundar conhecimentos sobre a biologia e ecologia de *P. thermophilum*. Para tal, estudou-se a sua morfologia, biologia (idade, crescimento e reprodução) e comportamento, *in situ*, em relação com o ecossistema hidrotermal.

Foram estudadas as características diagnosticantes dos espécimes capturados, de modo a verificar-se se a morfometria e merística se sobrepunha àquela descrita para *P. saldanhai*.

As análises das concentrações de mercúrio no músculo e no fígado destes peixes foram feitas com o objectivo de relacionar a concentração existente nestes tecidos deste metal, com o ambiente hidrotermal em que se insere, e com o facto de *P. thermophilum* ser um predador de topo na cadeia trófica.

2. Material e métodos

2.1. Recolha da amostra

Os 11 espécimes de *P. thermophilum* foram capturados em 2001 durante a DIVERSExpedition na Dorsal Medio-Atlântica, utilizando o DSV *Alvin* a bordo do R/V *Atlantis*, na qual participou uma equipa do DOP/Uaç.

Dois dos espécimes (3666-1 and 3667-1) foram capturados durante 6-7 de Julho de 2001 do campo hidrotermal Logatchev (Irina 2 site: 14°45.20'N; 044°58.80'W) a 3007 m de profundidade. Os restantes 9 espécimes (3672-1/2/3, 3673-1/2/3/4/5 e 3674-1) foram recolhidos entre 14 e 16 de Julho de 2001 no campo hidrotermal Snake Pit (Moose site: 23°22.90'N; 044°55.80'W) a 3490-3492 m de profundidade (Fig. 2). Os peixes foram capturados com o aspirador de fauna do submersível com excepção do indivíduo 3674-1 que foi capturado numa armadilha de pesca.

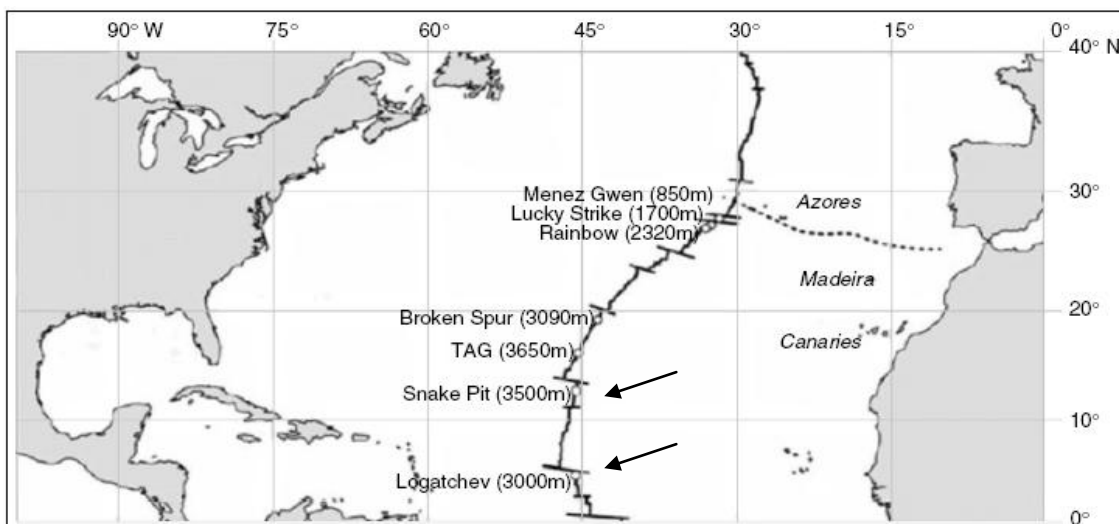


Figura 2 – Mapa indicando as posições e profundidades dos campos hidrotermais da Dorsal Médio-Atlântica. As setas indicam os locais onde foram capturados os espécimes (adaptado de STEFANNI *et al.* 2007).

Para a realização deste estágio estavam disponíveis apenas 6 espécimes (3673-1/2/3/4 e 3674-1 eviscerados e o indivíduo 3673-5 inteiro) e os fígados e gónadas de todos os indivíduos capturados. O material encontrava-se congelado a -80°C.

2.2. Descrição do habitat e do comportamento

O biótopo onde *P. thermophilum* vive foi caracterizado através da análise de vídeos obtidos *in situ* pelo submersível *Alvin* durante a missão DIVERSExpedition, 2001.

No total foram obtidas 06h23m13s de imagens vídeo nos campos hidrotermais Snake Pit, Logatchev e Broken Spur. As imagens, disponíveis no ImagDOP em formato VHS foram transcritas para formato digital para serem analisadas.

Durante a observação dos vídeos capturados durante o trajecto do submersível, teve-se especial atenção aos *P. thermophilum* avistados, para a descrição do seu comportamento, da fauna associada e do ambiente em que se inserem. As fotografias dos organismos associadas a hidrotermais foram capturadas com o programa PowerDVD[®], e configuradas no software AdobePhotoshop[®] 6.0.

2.3. Amostragem biológica

Em laboratório, os 6 espécimes existentes foram descongelados à temperatura ambiente, medidos (ao mm) e pesados (a 0,1 g). Antes dos exemplares serem preservados, retirou-se uma amostra de músculo para análise de mercúrio. Os otólitos foram removidos e conservados em glicerina. Do exemplar que não se encontrava amostrado retirou-se o fígado, a gónada e o estômago. Os peixes foram fixados em formol (5%) e conservados em álcool etílico (70%). Os dados morfométricos e merísticos foram obtidos nos peixes preservados.

2.4. Morfometria e merística

Para os 6 indivíduos estudados, efectuaram-se as medições apresentadas na Figura 3 e calcularam-se as proporções biométricas sumarizadas na Tabela 4. Os traços merísticos estudados estão apresentados na Tabela 5.

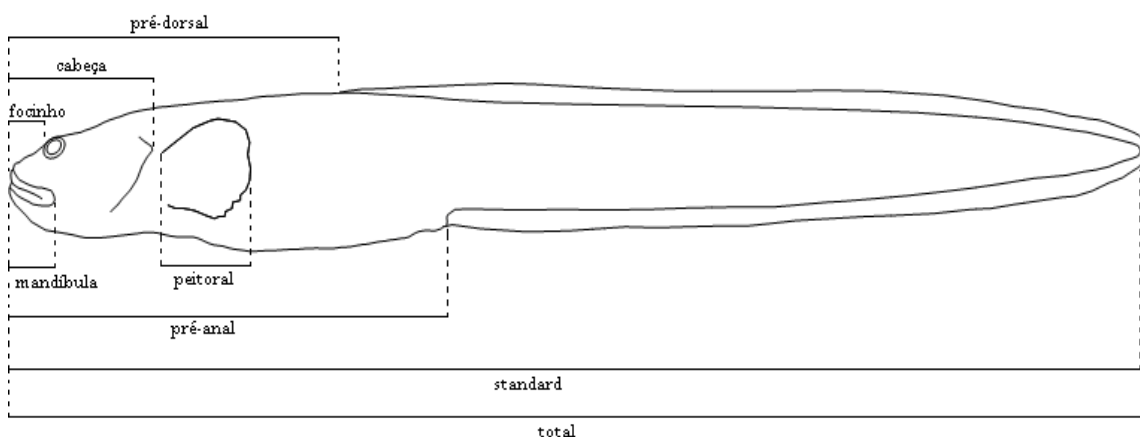


Figura 3 – Esquema das medições efectuadas em *P. thermophilum*.

Para a contagem das vértebras e dos raios das barbatanas ímpares (anal e dorsal), os 6 espécimes (3673-1/2/3/4/5 e 3674-1) foram radiografados no Hospital da Horta, utilizando um sistema digital de raios X Siemens AXIOM Aristos FX. Os peixes foram sujeitos a uma radiação de 42 kilovolts (kV) e 8 miliampéres por segundo (mAs). O tratamento final das imagens foi efectuado com o programa SIENET Sky Viewer.

2.5. Leitura dos otólitos

Após a dissecação, os otólitos dos 6 espécimes (3673-1/2/3/4/5 e 3674-1) estudados foram colocados em glicerina e analisados à lupa (Leica MZ 16 FA) equipada com o software Leica Application Suite. Os otólitos de cada espécime foram fotografados com o objectivo de identificar e contar os anéis de crescimento. A ampliação utilizada para a aquisição de fotos foi de 31.5 x, excepto para os otólitos do indivíduo 3674-1, cuja imagem foi ampliada 115.0 x. Neste trabalho assume-se que cada conjunto de uma banda opaca e uma hialina, corresponde a um ano de idade (ANEXO I).

2.6. Ecologia trófica

O estômago e intestino do indivíduo 3673-5 (único espécime inteiro) foram extraídos, fixados em formol (5%) e preservados em álcool (70%). Foram efectuados cortes ao longo do tubo digestivo, removendo todos os conteúdos

para uma caixa de Petri. Os conteúdos do tubo digestivo foram analisados no microscópio de dissecção. Os conteúdos foram identificados ao nível taxonómico mais baixo possível.

Neste trabalho são apresentadas as presas encontradas no tubo digestivo de *P. thermophilum*, identificadas por M. Segonzac (IFREMER) durante a DIVERSExpedition (SEGONZAC *et al.* 2001) (ANEXO II).

2.7. Concentração de mercúrio (Hg)

Todos os reagentes necessários ao processo de determinação da concentração de mercúrio no músculo e fígado, foram previamente preparados.

Para a determinação da concentração de Hg total no músculo foram retiradas amostras da região antero-dorsal de cada espécime. Os fígados a analisar (que tinham sido previamente amostrados) estavam congelados a -80°C.

As amostras foram liofilizadas, para sua completa desidratação, durante 24 horas num Liofilizador SAVANT RVT 400 (refrigerated vapor trap; bomba – VLP 120) (para imagem do equipamento ver ANEXO III).

Amostras de músculo e de fígado foram trituradas. De seguida pesou-se cerca de 0,1 g de amostra liofilizada em frascos de vidro. Para a digestão das amostras adicionou-se ácido sulfúrico a cada frasco. A adição de ácido sulfúrico a cada frasco e a inclusão dos frascos no banho, facilita a digestão do material a analisar. Nesta fase o ácido sulfúrico digere a matéria orgânica da amostra libertando o mercúrio presente no tecido. Por ter alto teor de gordura, o tempo de digestão integral das amostras de fígado é superior ao das amostras de músculo.

Posteriormente adicionou-se permanganato de potássio (KMnO_4) a cada um dos frascos. Este reagente oxida o mercúrio anteriormente libertado à sua valência máxima (Hg^{2+}). O cloreto de hidroxilamina adicionado de seguida a cada amostra, reduz o excesso de permanganato, obtendo-se uma solução incolor. Finalmente adicionou-se cloreto estanhoso a cada frasco, que reduz o Hg^{2+} a Hg^0 . A leitura de Hg foi efectuada no sistema analisador de mercúrio pela redução deste elemento a vapor. As análises foram efectuadas por

Espectrofotometria de Absorção Atômica Sem Chama (Bacharach Coleman Model 50 D). Para detalhes do método e equipamentos utilizado ver ANEXO IV.

2.8. Histologia das gónadas

As gónadas que se encontravam congeladas a -80°C , foram fixadas em Bouin durante 48h, antes de serem preservadas em álcool a 70%. Estes foram desidratados no processador de tecidos Leica TP1020. De seguida as porções de cada gónada foram completamente embebidas em parafina nova.

Os cortes, de 5 e de 7 μm de espessura, foram feitos com um micrótomo Leica RM 2035.

De seguida procedeu-se à coloração dos cortes histológicos com hematoxilina e eosina. As preparações definitivas foram montadas com DPX.

Os cortes histológicos das gónadas dos 11 indivíduos, foram observados e fotografados na lupa microscópica (Leica MZ 16 FA) a uma ampliação de 10x, utilizando o software Leica Application Suite (para descrição pormenorizada da técnica e equipamentos utilizados ver ANEXO V).

3. Resultados

3.1. Descrição do habitat e comportamento

Variadas espécies associadas ao hidrotermalismo foram avistadas durante o trajecto realizado pelo submersível *Alvin*, nos campos hidrotermais Snake Pit, Logatchev e Broken Spur.

3.1.1. Snake Pit

As imagens dominantes obtidas no campo hidrotermal Snake Pit mostraram grandes aglomerados de camarões *R. exoculata* nas chaminés de fluídos negros. As bases e os flancos dos sítios activos, são cobertos por mexilhões *B. puteoserpentis* sobre os quais se encontra a maioria dos indivíduos de *P. thermophilum*. Observaram-se, muito frequentemente, estes zoarcídeos próximos de anémonas *Maractis rimicarivora* e de ofiurídeos *O. Acies* que povoam também as bases das chaminés. Foi possível observar ainda a presença de camarões *C. chacei*, de caranguejos *S. mesatlantica* e de gastrópodes *Pseudorimula midatlantica* (Fig. 4).

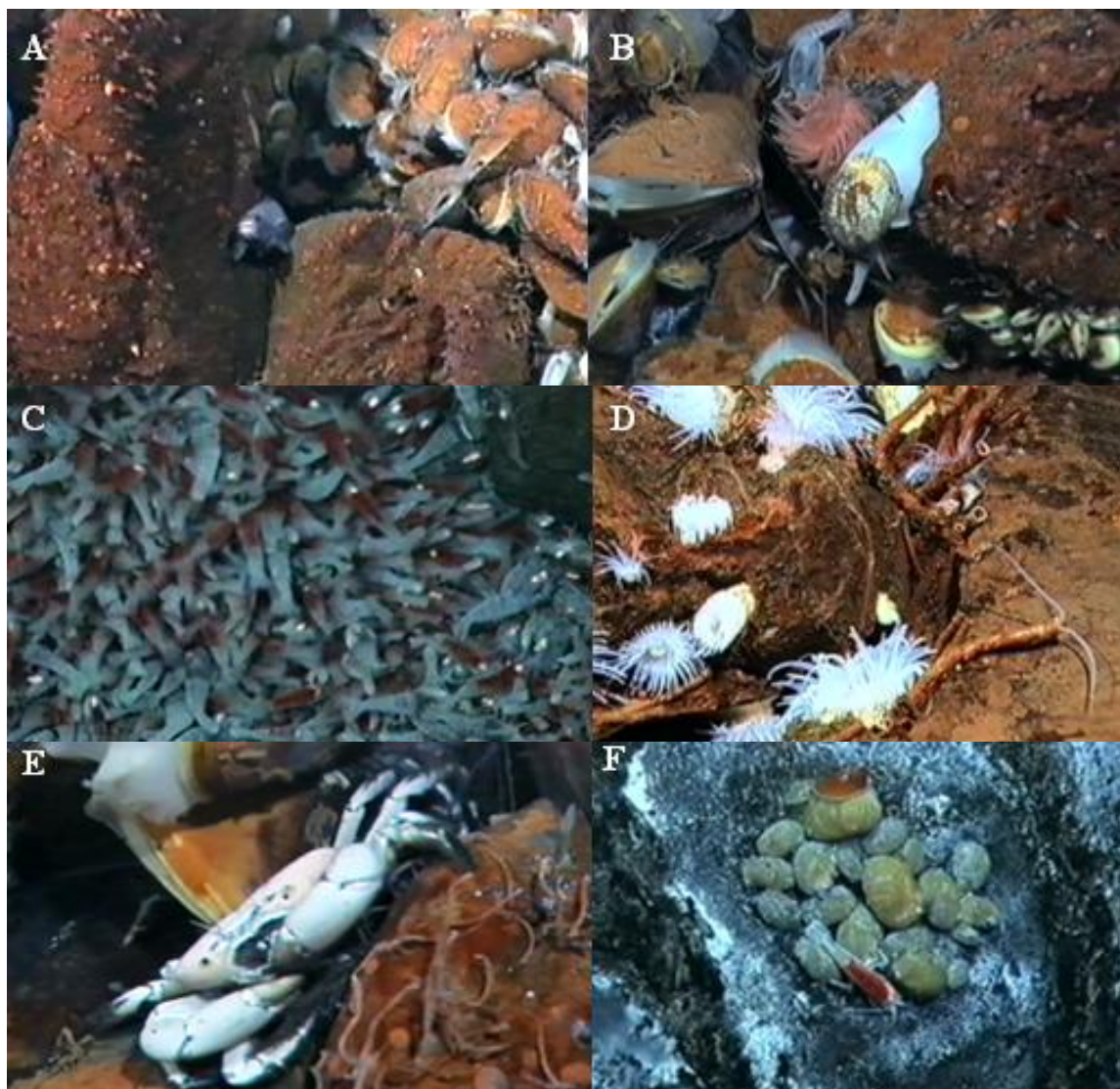


Figura 4 - Fotos da fauna existente em Snake Pit, obtidas a partir dos vídeos analisados: A- *P. thermophilum* entre os mexilhões; B- gastrópode *Phymorinchus ovatus* C- camarões *R. exoculata*; D- anémonas *Maractis rimicarivora*; E- caranguejos *S. mesatlantica*; F- Nudibrânquio sobre gastrópodes.

3.1.2. Logatchev

As imagens de vídeo dos arredores do campo hidrotermal Logatchev mostram fundo rochoso, com sedimento e sem fauna hidrotermal. Nas zonas mais próximas das fontes os mexilhões *Bathymodiolus* cobriam grandes áreas. Nas bases das chaminés activas encontravam-se grandes concentrações de camarões *R. exoculata*. Ofiurídeos pertencentes à espécie *O. acies*, galateas *Munidopsis* sp., estrela-do-mar *Brisinga endecacnemos* e gastrópodes *Phimorinchus ovatus* foram outros dos organismos que puderam ser observados neste campo hidrotermal (Fig. 5). *P. thermophilum* encontra-se

muito frequentemente nas bases de chaminés activas imóveis e apoiados em conchas de bivalves *B. puteoserpentis*.

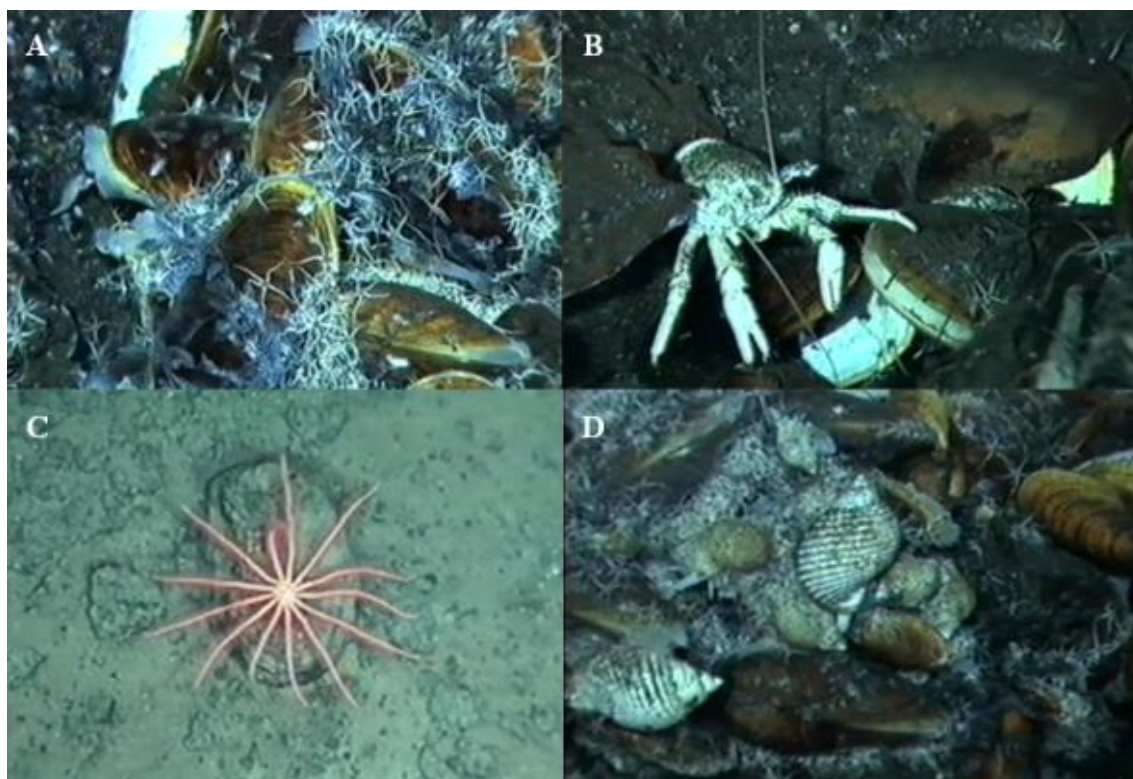


Figura 5 - Fotos da fauna existente em Logatchev obtidas a partir dos vídeos analisados: A – ofiurídeos *O. acies*; B – lagosta *Munidopsis* sp.; C- Estrela-do-mar *Brisinga endecacemos*; D – gastrópode *Pyimorynchus ovatus*.

3.1.3. Broken Spur

O Broken Spur tem como principal característica as lavas em almofada que constituem o fundo rochoso. A grande maioria dos peixes observados pertenciam à família Synphobranchidae (*Ilyophis saldanhai*), que ondulavam o corpo junto ao fundo. À semelhança dos outros campos hidrotermais, também aqui a fauna dominante incluía camarões *R. exoculata* e *M. fortunata*, bivalves *B. puteoserpentis* e ofiurídeos *O. acies* (Fig. 6). Nesta área, os 6 indivíduos de *P. thermophilum* observados, encontravam-se imóveis em contacto com o fundo rochoso, junto dos ofiurídeos.

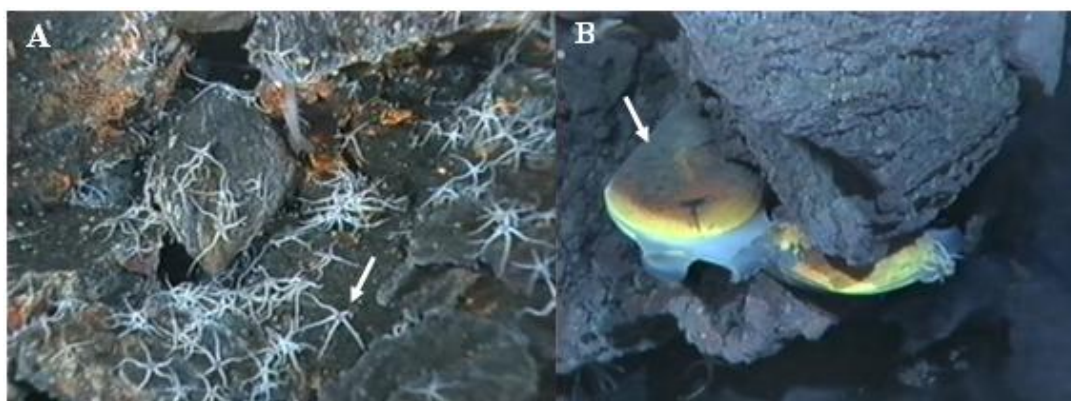


Figura 6 – Fotos do habitat a partir de observações de vídeos no campo hidrotermal Broken Spur: A - ofiurídeos *O. acies*; B – mexilhões *B. puteoserpentis*.

3.2. Abundância e densidade de *P. thermophilum*

As imagens recolhidas do campo hidrotermal Snake Pit permitiram-nos estimar as densidades máximas de *P. thermophilum* (Fig. 7).

Foram determinadas densidades máximas em seis grupos de *P. thermophilum*. A menor densidade foi de aproximadamente de $2/m^2$, e a densidade máxima observada foi de aproximadamente $7/m^2$.

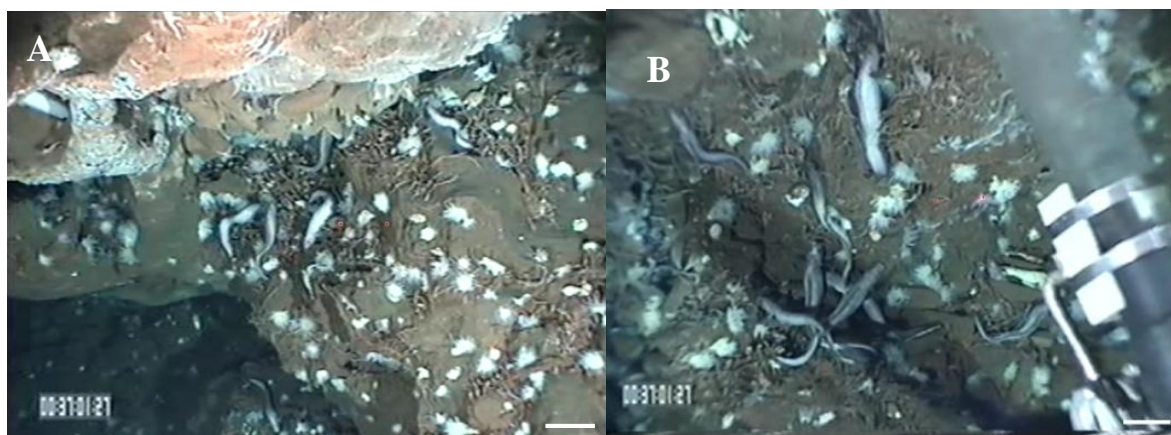


Figura 7 – Imagens do campo hidrotermal Snake Pit. A - grupo de *P. thermophilum* com uma densidade de cerca de 6 indivíduos por m^2 . B – grupo de *P. thermophilum* com uma densidade de cerca de 7 indivíduos por m^2 (escala: 10cm).

De acordo com as imagens de vídeo estruturadas, observou-se que a maior abundância de indivíduos de *P. thermophilum* ocorreu no Snake Pit, onde foram avistados aproximadamente 261 indivíduos. No campo hidrotermal Broken Spur apenas foram avistados 6 espécimes de *P. thermophilum* (Tabela 1), enquanto o sinafobranquídeo *Ilyophis saldanhai* era o peixe mais

abundante, especialmente na zona periférica das fontes activas. Em Logatchev a abundância do zoarcídeo era intermédia entre os valores encontrados para os outros dois campos hidrotermais.

3.3. Comportamento

P. thermophilum encontravam-se normalmente imóveis em contacto com o fundo. Quando em movimento apresentam um padrão de natação anguiliforme. Nos campos hidrotermais Snake Pit e Logatchev, encontravam-se muito frequentemente nas bases de chaminés de fumos negros.

Tabela 1 – Sumário das observações feitas relativamente ao habitat e comportamento de *P. thermophilum*.

Campo Hidrotermal	Nº Ind.	Local			Comportamento		Locomoção		
		Base de chaminé	Flanco de chaminé	Fundo rochoso	Imobilizado	Nadando	Barbatanas peitorais	Barbatanas anais/dorsais	Corpo todo
Logatchev	18								
Snake Pit	±261								
Broken Spur	6								

	Observado muito frequentemente
	Observado ocasionalmente
	Não observado

3.4. Amostragem biológica

Os 11 exemplares de *P. thermophilum* capturados possuíam comprimentos totais (CT) entre 219 e 350 mm (média 295 mm CT). A amostra era composta por 8 fêmeas e 3 machos que apresentavam o mesmo valor médio de comprimento total (295 mm CT). No entanto, os 6 peixes que foram amostrados tinham comprimentos mais homogéneos (mínimo 267 mm, máximo 350 mm CT), embora o seu peso tenha variado entre 70,4 e 114,2 g (Tabela 2).

Tabela 2 – Comprimento Total (mm), peso eviscerado (g) e sexo de *P. thermophilum* estudados.

Espécime	CT (mm)	Peso Eviscerado (g)	Sexo
LG 3666-1	319		F
LG 3667-1	290		F
SP 3672-1	219		F
SP 3672-2	260		M
SP 3672-3	329		F
SP 3673-1	291	97,7	F
SP 3673-2	350	95,7	F
SP 3673-3	312	114,2	M
SP 3673-4	292	65,6	F
SP 3673-5	312	70,4	M
SP 3674-1	267	73,4	F

A relação entre peso eviscerado e comprimento total, obtida para os 6 peixes, tem valor muito baixo de r ($r^2 = 0,17$), provavelmente devido ao número reduzido de exemplares (Fig 8).

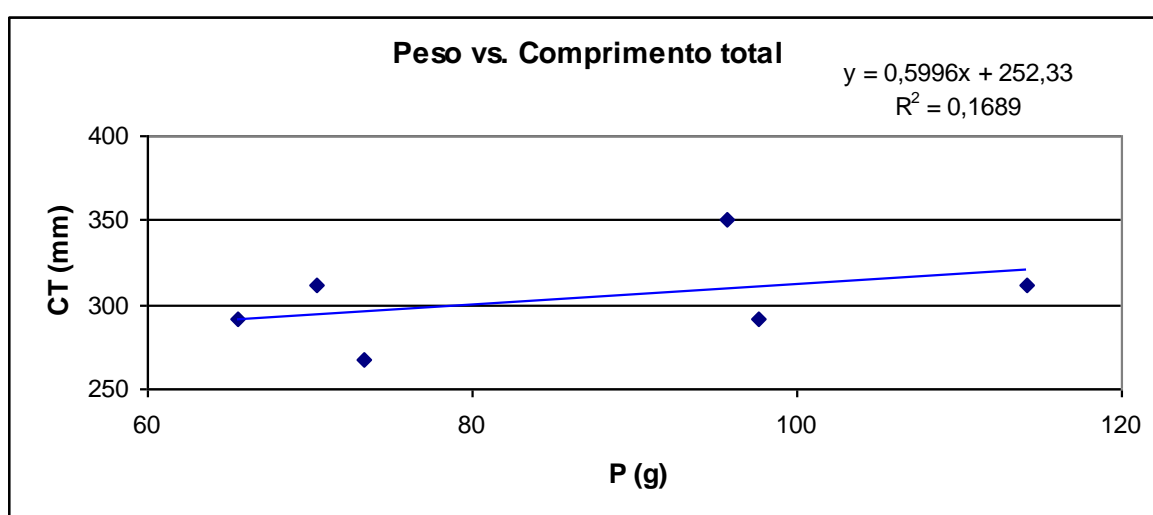


Figura 8 - Relação entre o peso eviscerado (P) em gramas (g) e o comprimento total (CT) em milímetros (mm) em exemplares de *P. thermophilum*.

3.5. Morfometria e merística

As medidas e os índices morfométricos obtidos para cada espécime estão apresentados na Tabela 3. Mesmo considerando que os indivíduos estudados apresentam alguma diferença relativamente ao comprimento total (ca. 7 cm), verifica-se que os valores obtidos para os diferentes índices

calculados têm uma variabilidade muito reduzida. No entanto, a variabilidade é maior em relação aos índices que usam o comprimento da cabeça como escala, em relação ao comprimento standard.

Tabela 3 – Medições e proporções de *P. thermophilum*.

	Espécime						Média	Desv. P.
	3673-1	3673-2	3673-3	3673-4	3673-5	3674-1		
Comprimento standard (CS)	287	350	307	288	306	265	300,5	26,2
Comprimento cabeça (CC)	40,0	45,0	44,8	39,9	44,1	36,8	41,8	3,1
Índices morfométricos em percentagem do comprimento standard								
Comprimento da cabeça	13,9	12,9	14,6	13,9	14,4	13,9	13,9	0,6
Largura da cabeça	7,3	6,1	8,6	6,8	6,9	7,5	7,2	0,7
Altura da cabeça	9,0	8,0	9,5	8,1	8,7	9,4	8,8	0,6
Comprimento barbatana peitoral	9,7	7,0	9,8	8,9	7,9	9,1	8,7	1,0
Comprimento pre-dorsal	20,5	19,3	22,5	21,4	21,6	22,7	21,3	1,2
Comprimento pre-anal	38,7	38,5	37,5	37,2	39,0	39,7	38,5	0,9
Altura do corpo (nível do ânus)	11,3	9,0	11,6	9,8	9,2	11,5	10,4	1,1
comprimento fendas branquiais	5,9	4,2	4,6	4,5	5,2	5,3	5,0	0,6
comprimento barbatana caudal	1,4	-	1,6	1,5	1,1	0,7	1,2	0,3
Índices morfométricos em percentagem do comprimento da cabeça								
Largura da cabeça	52,3	47,8	58,7	48,9	48,1	53,8	51,6	3,9
Altura da cabeça	64,8	62,2	65,0	58,6	60,5	67,7	63,1	3,0
Mandíbula superior	27,0	28,9	35,9	25,6	33,8	24,7	29,3	4,2
Barbatana peitoral	69,5	54,4	67,4	64,4	55,1	55,4	61,1	6,2
Comprimento do focinho	26,8	27,8	26,6	23,1	26,8	21,5	25,4	2,3
Diâmetro do ocular	17,0	12,9	12,9	13,3	12,9	16,0	14,2	1,7
Largura interorbital	20,5	16,0	19,9	20,8	17,9	22,6	19,6	2,1
Comp. barbatana pélvica	5,5	5,1	7,8	6,3	6,8	5,7	6,2	0,9

Os dados de merística dos 6 espécimes de *P. thermophilum* estão sumarizados na Tabela 4. Um esquema dos poros do sistema lateral cefálico contados pode ser observado na Figura 9. A contagem dos raios das barbatanas ímpares nas radiografias (Fig. 10) mostrou-se eficaz, ao contrário das tentativas feitas nos indivíduos preservados. A variabilidade observada foi muito reduzida.

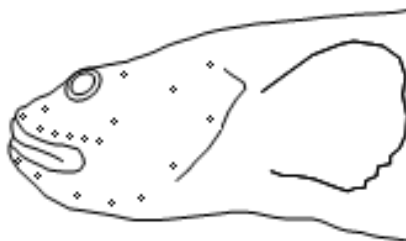


Figura 9 – Esquema representativo da localização dos poros do sistema lateral cefálico de *P. thermophilum*.

Tabela 4 – Dados merísticos de *P. thermophilum*. * contagens feitas em radiografias. ¹ 1º raio da barbatana dorsal inserido ao nível da 7ª vértebra.

	Espécime						Média	Desv. P.
	3673-1	3673-2	3673-3	3673-4	3673-5	3674-1		
Vértebras *	112	112	111	112	114	112	112,2	0,9
Raios barbatana dorsal * ¹	105	104	104	105	106	105	104,8	0,7
Raios barbatana anal *	86	85	85	86	87	86	85,8	0,7
Raios barbatana peitoral	18	17/18	18	18	18	18	18,0	0,0
Raios barbatana pélvica	2	2	2	2	2	2	2,0	0,0
Branquiespinhas	16	16	15	16	16	16	15,8	0,4
Arcos branquiostegais	6	6	6	6	6	6	6,0	0,0
Poros suborbitais	5	6	6	6	6	7	6,0	0,6
Poros postorbitais	2	2	2	2	2	2	2,0	0,0
Poros preoperculomandibulares	8	8	8	7	8	8	7,8	0,4
Poros nasais	2	2	2	2	2	2	2,0	0,0



Figura 10 – Radiografias dos espécimes de *P. thermophilum* (3673-1/2/3/4/5 e 3674-1) capturados no campo hidrotermal Snake Pit.

3.6. Idade

Os otólitos arredondados têm a face interna achatada e a parte externa convexa. Em todos os otólitos foi possível observar bandas opacas alternadas com bandas hialinas, sendo o anel de crescimento mais exterior opaco (Fig. 11).

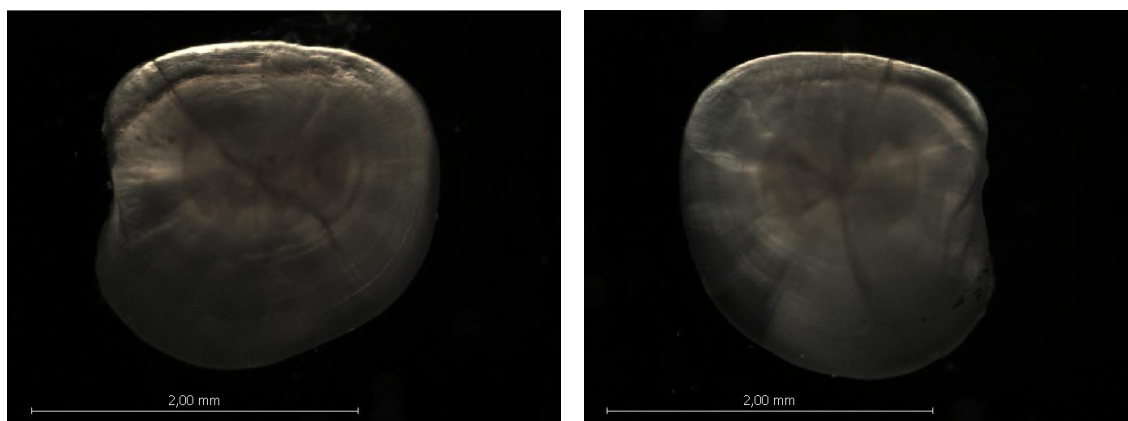


Figura 11 – Otólitos do indivíduo 3673-4

Relativamente aos parâmetros, comprimento do otólito e comprimento total, pôde verificar-se que há uma relação ($r^2 = 0,74$) de proporcionalidade: isto é, os indivíduos maiores possuem otólitos maiores, embora se tenha observado que indivíduos com comprimentos totais semelhantes possuíam comprimentos de otólitos ligeiramente diferentes (Figura 12).

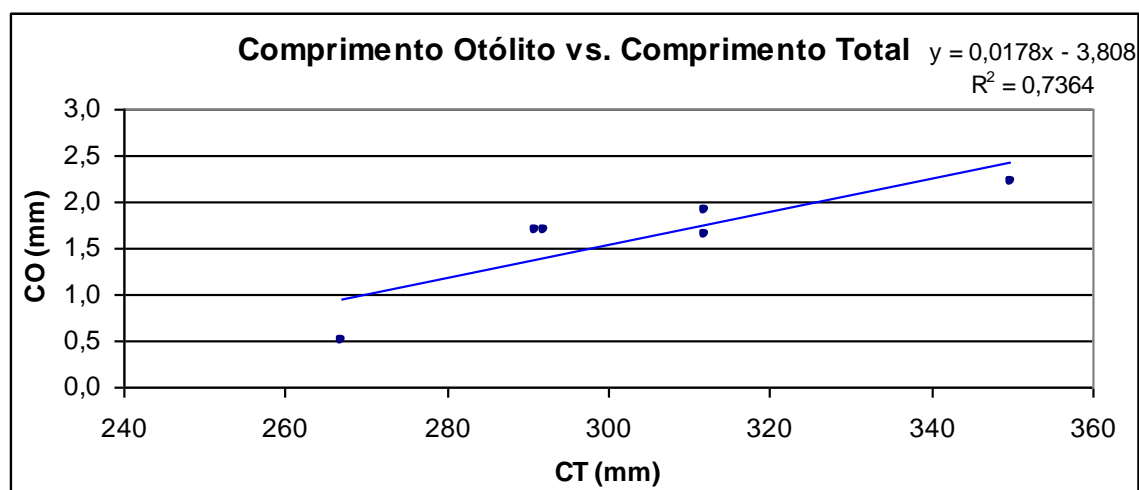


Figura 12 – Relação entre o comprimento dos otólitos (CO) em milímetros (mm) e o comprimento total (mm) de *P. thermophilum*.

O número de anéis de crescimento (opacos e hialinos), foi relacionado com o comprimento total dos indivíduos (Fig. 13). Observou-se que os peixes mais pequenos apresentavam menos anéis de crescimento (mais novos), e que os peixes maiores tinham mais anéis (mais velhos). O valor de r ($r^2 = 0,81$), indica que há uma boa relação entre estes dois parâmetros.

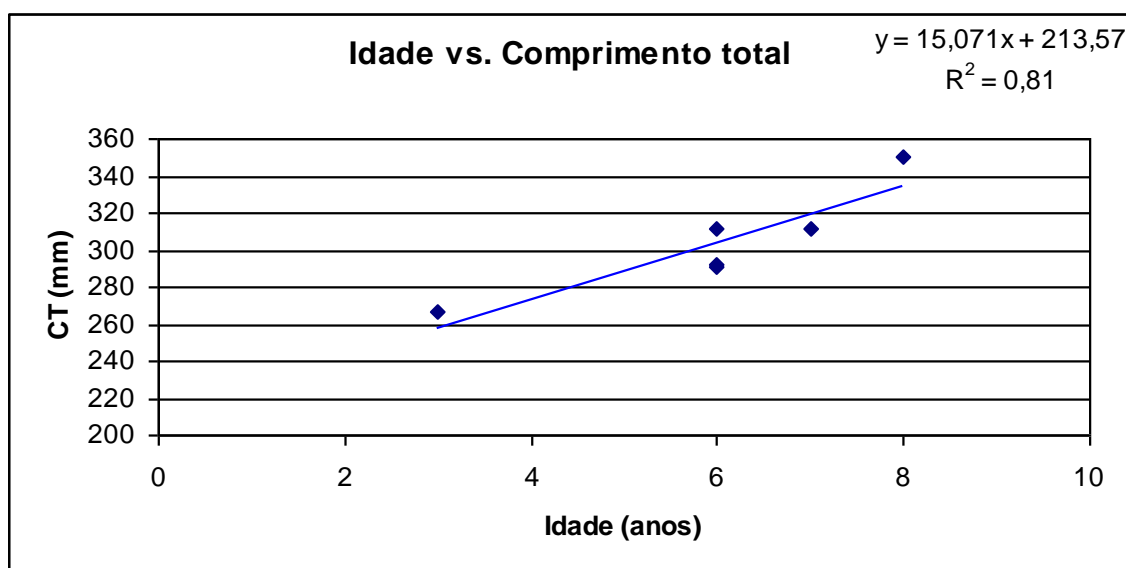


Figura 13 – Relação entre a idade (anos) de cada indivíduo e o respectivo comprimento total em milímetros (mm) de *P. thermophilum*.

3.7. Ecologia trófica

Nos conteúdos estomacais e intestinais dos 10 dos espécimes capturados estudados por M. Segonzac (IFREMER) foram identificados camarões hidrotermais (i.e. *R. exoculata*), poliquetas não determinados e várias espécies de moluscos hidrotermais (i.e. *B. puteoserpentis*; *Phymorynchus* sp., *Shinkailepas briandi*) (ANEXO II).

O estômago do único indivíduo que não tinha sido previamente estudado (3673-5) encontrava-se vazio. Nos intestinos foi possível identificar um indivíduo *R. exoculata* juvenil e um télson, provavelmente de *C. chacei*.

3.8. Concentração de mercúrio (Hg)

A concentração de Hg obtida no músculo e fígado dos 6 exemplares de *P. thermophilum*, estão apresentadas na Tabela 5.

As análises mostraram que a concentração de Hg no músculo é muito variável entre os indivíduos analisados. Em dois exemplares (3673-1; 3673-4), os valores obtidos são muito elevados, enquanto que em 3673-2; 3673-3 e 3674-1 a ocorrência deste metal foi apenas vestigial.

Relativamente aos valores obtidos para o fígado, verificou-se que esta discrepância na concentração de Hg não é tão acentuada. No entanto, os valores mais altos de Hg foram obtidos nos indivíduos 3673-1, 3673-4 e 3673-5, exactamente os mesmos que tinham as maiores concentrações de Hg no músculo. Na maioria dos espécimes, a concentração de Hg foi superior no músculo do que no fígado (Tabela 5).

Tabela 5 – Comprimento total (mm), pesos (g), concentração ($\mu\text{g/g}$) de Hg em músculo e fígado de *P. thermophilum*.

Espécime	CT (mm)	Peso (g)	Idade	Hg músculo	Hg F
3673-1	291	97,7	6	1,60	0,76
3673-2	350	95,7	8	0,05	0,20
3673-3	292	114,2	7	0,07	0,05
3673-4	267	65,6	6	2,32	0,80
3673-5	312	70,4	6	0,55	0,25
3674-1	312	73,4	3	0,03	0,10

3.9. *Biologia reprodutiva*

A análise microscópica dos cortes histológicos das gónadas de *P. thremophilum* permitiu-nos avaliar em que estado de maturação se encontravam os espécimes no momento em que foram capturados (Fig. 14).

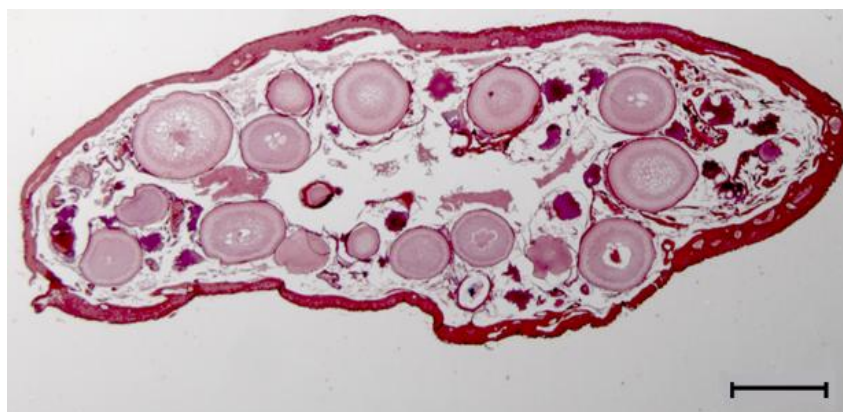


Figura 14 – Fotografia de gónada feminina de *P. thermophilum* (espécime 3666-1) (ampliação 10x; escala - 1mm).

Neste estudo não foi possível ter uma noção clara da organização tridimensional dos ovários, visto que o material se encontrava em más

condições de preservação. No entanto, foi possível observar que todas as fêmeas se encontravam em estados de maturação avançados, em estado de postura ou pré-postura, correspondendo ao estágio IV. Algumas fêmeas, tinham oócitos hidratados, formando uma matriz gelatinosa cor-de-rosa. O corte histológico da gónada do indivíduo 3673-2 mostra uma estrutura central muito desenvolvida com dimensões muito superiores às dos oócitos que presumivelmente poderá ser um embrião em desenvolvimento. A gónada do indivíduo 3672-3 também apresentava, aparentemente, início de desenvolvimento embrionário (Fig. 15).

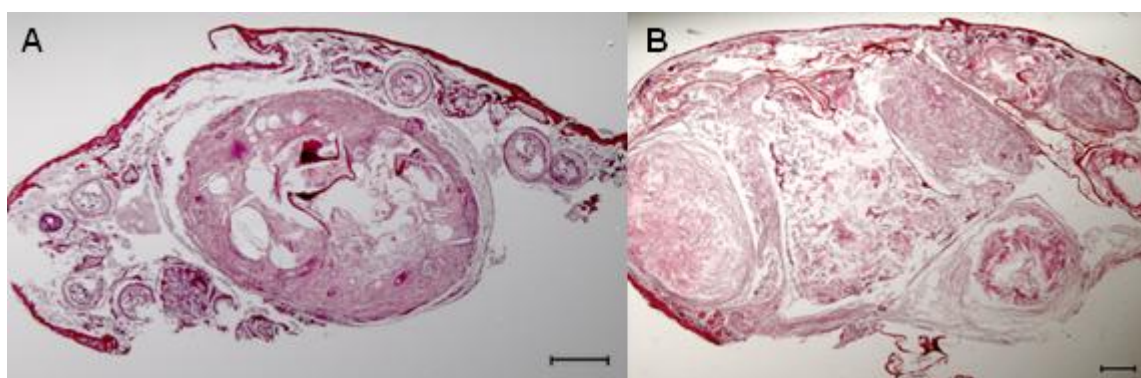


Figura 15 – Fotografia de cortes histológicos de gónadas femininas. A - gónada do indivíduo 3673-2 (ampliação 10x; escala - 1mm). B - gónada do indivíduo 3672-3 (ampliação 7,11x ; escala: 1mm).

Em relação aos dois espécimes do sexo masculino, observou-se que os testículos se encontravam em fase de repouso, ou seja, no estágio I. No entanto, o espécime 3673-3 apresentava início de actividade de espermatogónias, sendo possível observar algumas destas células. Os tubos seminíferos apresentavam algum espaço entre si. O lúmen dos mesmos não continha esperma, tal como o espermoducto. No indivíduo 3673-5 não foi visível actividade de espermatogónias. Os testículos apresentavam muito espaço entre tubos seminíferos que não continham esperma no seu lúmen. A existência de esperma também não foi confirmada no espermoducto (Fig. 16).

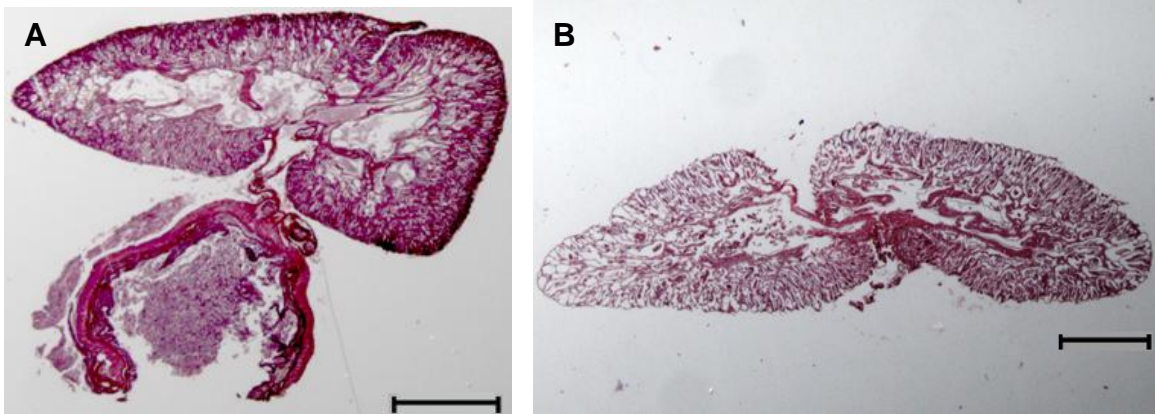


Figura 16 – Fotografias dos cortes histológicos das gónadas masculinas de *P. thermophilum*: A – espécime 3673-3; B – espécime 3673-5 (ampliação 10x; escala - 1mm).

4. Discussão

4.1. Comportamento e ecologia

Em alguns campos hidrotermais encontraram-se elevadas densidades de peixes predadores como *P. thermophilum*, sugerindo que a predação pode ter impactos significativos nas comunidades bêmicas hidrotermais (MICHELI *et al.* 2002). As densidades de indivíduos de *P. thermophilum* só puderam ser estimadas quando era possível visualizar os laser's de medição e quando eles se encontravam no mesmo plano. Assim, nalguns casos em que o número de peixes por metro quadrado era visivelmente elevado, não foi possível fazer uma aproximação da sua densidade. As densidades foram estimadas apenas com base em imagens retiradas dos vídeos capturados no Snake Pit, o que também está relacionado com a abundância deste peixe ser muito superior à abundância nos outros campos hidrotermais (Logatchev e Broken Spur). Muito frequentemente os indivíduos ou grupos de indivíduos estavam imóveis sobre o fundo, o que leva a questionar se este comportamento é normal ou se é desencadeado pela presença das luzes do submersível. Se este comportamento é normal, e como os conteúdos estomacais revelaram que estes peixes se alimentam principalmente de camarões *R. exoculata* e *P. ovatus*, pensa-se que *P. thermophilum* ataca presas isoladas dos aglomerados. Esta ideia é ainda sustentada no facto destes peixes não serem observados perto dos aglomerados de camarões que se concentram preferencialmente no topo das fontes hidrotermais. Estes peixes formam grupos de maiores densidades nas proximidades das fontes hidrotermais, locais onde se concentram as suas presas.

4.2. Amostragem biológica

Embora so tenham sido estudados 11 espécimes, a amostragem biológica revelou que existe maior abundância de fêmeas (8) do que machos (3)

4.3. Morfometria e merística

Os espécimes analisados são sem dúvida pertencentes à espécie *P. thermophilum*. A grande maioria das características observadas anteriormente para esta espécie, foram também verificadas neste estágio. Pôde observar-se que todos os espécimes apresentavam boca grande e terminal, focinho arredondado e olhos grandes, tal como tinha descrito GEISTDOERFER (1994). As proporções em percentagem das medições das diferentes partes do corpo obtidas neste estudo, estão em concordância com a descrição feita por GEISTDOERFER (1994) e PARIN (1995). A média dos índices morfométricos de cada indivíduo é muito semelhante ao índice morfométrico calculado por estes autores. Por exemplo, a média dos índices morfométricos registados relativamente ao comprimento standard para a cabeça foi de 13,9%, comprimento pre-dorsal 21,3%, comprimento pre-anal 38,5%, barbatana peitoral 8,7%, valores próximos dos valores registados por GEISTDOERFER (1994), sendo de 13,7%, 23,1%, 44,3% e 7,4% respectivamente para as mesmas partes do corpo.

GEISTDOERFER (1994), identificou 16 poros de cada lado, no sistema lateral cefálico: 2 poros supra-orbitais (nasais), 6 sub-orbitais, 2 pós-orbitais e 6 pre operculomandibulares. Por sua vez, PARIN (1995), identificou 19 poros na linha lateral cefálica: 2 nasais, 7 sub-orbitais, 2 pós-orbitais e 8 pre operculomandibulares. Neste estudo foi possível identificar no sistema lateral cefálico 18 poros de cada lado: 2 poros nasais, 6 poros sub-orbitais, 2 poros pós-orbitais e 8 pre-operculomandibulares. Assim, o número de poros identificados estava dentro dos limites definidos.

Neste trabalho, através das observações morfológicas dos espécimes capturados em Snake Pit pôde comprovar-se as diferenças morfológicas entre *P. thermophilum* e *P. saldanhai*. BISCOITO & ALMEIDA (2004), descreveram *P. saldanhai* capturados no campo hidrotermal Rainbow. *P. thermophilum* apresenta apenas uma linha medio-lateral enquanto que, de acordo com BISCOITO & ALMEIDA (2004), *P. saldanhai* possui uma linha lateral com dois ramos. Observou-se que estes exemplares de *P. thermophilum* têm menor número de vértebras do que *P. saldanhai* (111-114 vs. 117-123), menor número de raios na barbatana dorsal (104-106 vs. 108-115) e na barbatana

anal (85-87 vs. 90-95). *P. thermophilum* apresenta uma menor relação distância interorbital/comprimento da cabeça (proporção relativamente à cabeça: 7,2-8,9 vs. 10,8-17,5).

Relativamente à existência de linha lateral no *P. thermophilum* constata-se que as opiniões divergem entre os diferentes autores. No entanto, observou-se neste trabalho que estes peixes apresentam uma linha médio-lateral difícil de identificar.

De acordo com BISCOITO *et al.* 2001, os restantes campos hidrotermais situam-se 1100 Km a Sul do campo hidrotermal Rainbow, o que pode explicar as diferenças morfológicas entre *P. saldanhai* e a espécie descrita neste trabalho (STEFANNI *et al.* 2007). No entanto seria necessário possuir mais indivíduos do campo hidrotermal Rainbow para re-confirmar este assunto, tanto do ponto de vista morfológico como genético. Outro aspecto a considerar é que as duas espécies, se de facto existirem, poderão co-existir em Rainbow e que o exemplar estudado por STEFANNI *et al.*, 2007 seja o *P. thermophilum*.

4.4. Idade

A relação demonstrada nos resultados permitiu afirmar que quanto maior é o peixe, maior é o número de anéis opacos e hialinos, ou seja, maior é a sua idade. Notou-se assim que os peixes apresentavam crescimento regular ao longo do tempo de vida. Embora o número de indivíduos estudados seja muito reduzido, a análise indica que se poderá estimar a idade dos peixes com base no seu comprimento total.

O facto de todos os otólitos analisados apresentarem o anel de crescimento mais exterior opaco, indica que a deposição dos anéis de crescimento é sazonal, já que os indivíduos foram apanhados todos na mesma altura (Julho de 2001). A sua forma convexa dificultou a focagem aquando da sua observação. Durante a pesquisa bibliográfica, não foram encontrados artigos sobre otólitos de peixes de hidrotermais. Este estudo, por serem observados anéis de crescimento, indica que existe sazonalidade no mar profundo.

As comunidades do mar profundo são influenciadas por “inputs” sazonais de matéria orgânica a partir da superfície, o que significa maior disponibilidade de alimento (RUHL & SMITH, 2004). Aqui pode estar a explicação para a sazonalidade nos campos hidrotermais.

4.5. Concentração de mercúrio (Hg)

O mercúrio (Hg) é um metal pesado tóxico com particular preocupação como poluente nas cadeias tróficas marinhas. É transportado no ambiente por ar e água, bem como por organismos biológicos através da cadeia alimentar, sendo o único metal que biomagnifica na mesma (SEIXAS *et al.* 2005; MARTINS *et al.* 2006). As concentrações nos tecidos dos organismos aquáticos aumenta ao longo do tempo de vida, visto que o mercúrio bioacumula (MONTEIRO *et al.* 1996). Os peixes de profundidade são tendencialmente predadores de topo, alimentando-se a níveis tróficos superiores. Assim, o potencial para acumulação de metais, particularmente de mercúrio, é mais elevado em espécies de profundidade. O mercúrio injectado pelos fluídos hidrotermais tornam o ambiente circundante num local muito tóxico para os organismos. Sendo *P. thermophilum* um predador de topo na cadeia alimentar da comunidade associada ao hidrotermalismo, os resultados esperados seriam valores elevados de concentrações de Hg, tanto no músculo como no fígado, devido ao facto dos predadores acumularem maiores concentrações de Hg nos seus tecidos do que as presas (GEISTDOERFER 1994; MARTINS *et al.* 2006).

No estudo de concentrações de mercúrio, notou-se que os espécimes que apresentavam valores superiores de Hg, continham maior concentração no músculo do que no fígado. De acordo com MARTINS *et al.* (2006), apesar do fígado apresentar um papel importante na desintoxicação de mercúrio, este metal pode não ser armazenado neste órgão. O mercúrio pode ser captado pelos peixes, desintoxicado pelo fígado e armazenado noutros tecidos. Além disso, diferentes espécies de peixes podem apresentar diferentes taxas de metabolismo e diferentes taxas de eliminação de metais. O tamanho do animal também é reconhecido como um factor importante na determinação da taxa de processos fisiológicos que influenciam a captação, distribuição e eliminação de

mercúrio. Os níveis deste elemento nos peixes aumentam com o tamanho do corpo. Desta forma, peixes maiores e mais velhos possuem geralmente concentrações mais elevadas do que em peixes mais pequenos e novos. No entanto, neste grupo de espécimes de *P. thermophilum*, não foi encontrada nenhuma relação entre as concentrações de Hg e o tamanho corporal nem com a idade. Como o número de espécimes analisados foi muito reduzido, apenas 6, sugere-se que novas colheitas e novas análises sejam feitas futuramente, de modo a obter-se conclusões mais fiáveis.

4.6. Biologia reprodutiva

O facto das gónadas terem sido submetidas a congelação e descongelação, pode ter interferido na qualidade dos cortes histológicos resultantes, pelo que não se conseguiu obter os desejados resultados. Para além disso, o número de gónadas disponíveis eram apenas 11.

A não observação de actividade de espermatogónias numa das gónadas masculinas analisadas (3673-5), pode estar relacionada com o mau estado de conservação das gónadas.

O facto de as fêmeas se encontrarem em fase de postura, enquanto que os machos se encontravam em estado de repouso, pode ser um indício de fecundação interna. No entanto não foi identificado nenhum órgão nos espécimes machos que evidenciasse tal facto.

Para este trabalho sugeriu-se uma medição dos oócitos, para avaliar se existiam entre eles diferentes tamanhos, que pudessem indicar que o período de reprodução fosse mais ou menos alargado (GEISTDOERFER 1994). No entanto, tais medições não foram efectuadas devido ao facto do núcleo não ser observado, e também porque os cortes podem ter segmentado os oócitos a diferentes níveis. De qualquer forma, na maioria dos ovários observaram-se tamanhos homogéneos nos oócitos contidos, à excepção de dois indivíduos que apresentavam estruturas com dimensões muito superiores às dos oócitos, que presumivelmente poderão ser embriões em desenvolvimento.

Deveriam ter sido feitos vários cortes transversais, de modo a conseguir ver-se o desenvolvimento das gónadas nas suas várias secções.

5. Conclusões

Neste trabalho concluiu-se que o peixe estudado, pertencente à espécie *P. thermophilum*, vive próximo de chaminés de fumos negros, num ecossistema com fauna hidrotermal bastante variada. Este zoarcídeos, normalmente imóveis em contacto com o fundo, formam grupos, por vezes de grandes densidades, e nunca são encontrados em áreas afastadas das fontes hidrotermais, o que justifica uma clara dependência trófica destes locais. Constatou-se que a abundância deste peixe é muito superior no campo hidrotermal Snake Pit do que no Logatchev e Broken Spur.

Embora o número de indivíduos estudados fosse pequeno, pôde-se concluir que é possível estimar a idade destes peixes através do seu comprimento.

O facto de alguns indivíduos de *P. thermophilum* terem elevadas concentrações de Hg nos seus tecidos, enquanto outros apresentam concentrações vestigiais, leva a considerar-se que sejam realizadas novas investigações em relação a este aspecto.

Sugere-se que futuramente sejam efectuadas novas pesquisas e se possível com um número superior de indivíduos, para confirmar os aspectos relacionados com a biologia e ecologia desta espécie. A sua biologia reprodutiva necessita futura confirmação.

6. Agradecimentos

Aos meus pais pelo apoio.

Aos meus orientadores, Doutor Filipe Porteiro e Doutora Ana Colaço, pela oportunidade e disponibilidade.

À Domitília pela ajuda em todo o processo de histologia das gónadas, e contagem dos anéis de crescimento nos otólitos.

Ao Dr. Paulo Moura e Dr. Sérgio Morais do Hospital da Horta, pela disponibilidade de radiografar os peixes.

Ao Doutor Humberto e Luís Pires pelo apoio no laboratório de química durante o processo de análise de mercúrio.

Ao Doutor Raul Bettencourt, Doutor Sérgio Stefanni e Doutora Paula Aguiar pelas formações básicas e ajudas na captação de imagens no microscópio e na lupa.

À Dra. Ana Mendonça pela ajuda na análise das gónadas.

7. Referências bibliográficas

BISCOITO, M. & A. J. ALMEIDA 2004. New species of *Pachycara* Zugmayer (Pisces: Zoarcidae) from the Rainbow Hydrothermal Vent Field (Mid-Atlantic Ridge). *Copeia*, 3, 562–568.

BISCOITO, M., M. SEGONZAC & A. J. ALMEIDA 2001. New zoarcid fish species from deep-sea hydrothermal vents of the Atlantic and Pacific Oceans. *International Ridge-Crest Research*. 10(1)

BISCOITO, M., M. ALMEIDA & M. SEGONZAC 2006. Preliminary biological characterization of the Saldanha hydrothermal field at the Mid-Atlantic Ridge (36°34'N, 32°26'W, 2200 m). *Les Cahiers de Biologie Marine*. 47: 421- 427.

COLAÇO, A. 2001. Trophic Ecology of Deep-Sea hydrothermal vents from the Mid Atlantic Ridge. PhD Dissertation, University of Lisbon, Lisbon, Portugal.

COPLEY, J. T. P., P. A. TYLER, B. J. MURTON & C. L. VAN DOVER 1997. Spatial and interannual variation in the faunal distribution at Broken Spur vent field (29°N, Mid Atlantic Ridge). *Marine Biology* 129: 723-733.

DESBRUYÈRES, D. & M. SEGONZAC 1997. *Handbook of deep-sea hydrothermal vent fauna*. Éditions IFREMER, Brest. 279 pp.

DESBRUYÈRES, D., SEGONZAC, M & M. BRIGHT 2006. *Handbook of deep-sea hydrothermal vent fauna* (2th edition). Denisia 18. Landesmuseum Linz, Austria. 544 pp.

FROESE & PAULY, 2008. *Pachycara thermophilum*. In: <http://www.fishbase.org/summary/SpeciesSummary.php?id=56728> . (Último acesso a 3 de Dezembro de 2008).

GEBRUK, A. V., P. CHEVALDONNÉ, T. SHANK, R. A. LUTZ & R. C. VRIJENHOEK 2000. Deep-sea hydrothermal vent communities of the Logatchev area (14°45'N, Mid-Atlantic Ridge): diverse biotopes and high biomass. *Journal of Marine Biology Association of the United Kingdom*, 80, 383-393.

GEISTDOERFER, P. 1994. *Pachycara thermophilum*, une nouvelle espèce de poisson Zoarcidae des sites hydrothermaux de la dorsale Médio-Atlantique. *Cybium* 18(2): 109-115.

KELLEY, D. S., G.L. FRÜH-GREEN, J.A. KARSON & K. A. LUDWING 2007. The Lost City Hydrothermal Field Revisited. *Oceanography* 20 (4): 80-89.

MARTINS, I., V. COSTA, F. M. PORTEIRO, A. COLAÇO & R.S. SANTOS 2006. Mercury concentrations in fish species caught at Mid-Atlantic Ridge hydrothermal vent fields. *Marine Ecology Progress Series*. 320: 253-258.

MENDONÇA, A., E. ISIDRO, G. MENEZES, M. R. PINHO, O. MELO & S. ESTÁCIO 2006. New contribution to the reproductive features of bluemouth *Helicolenus dactylopterus dactylopterus* from the northeast Atlantic (Azores Archipelago). *Scientia Marina*.70(4).

MICHELI, F., C. H. PETERSON, L. S. MULLINEAUX, C. R. FISHER, S.W. MILLS, G. SANCHO, G. A. JOHNSON & H. S. LENIHAN 2002. Predation structures communities at deep-sea hydrothermal vents. *Ecological Monographs*. 72(3): 365-382.

MONTEIRO, L. R., V. COSTA, R. W. FURNESS & R. S. SANTOS 1996. Mercury concentrations in prey fish indicate enhanced bioaccumulation in mesopelagic environments. *Marine Ecology Progress Series*. 141: 21-25.

MOYLE, P. B. & J. J. CECH 1996. An introduction to Ichthyology (3th edition). Prentice Hall, inc.

OBIS, 2008. Point map for *Pachycara thermophilum*. In <http://www.obis.org.au>. (Último acesso a 14 de Dezembro).

PARIN, N.V. 1995. Deep-sea Fishes, *Haptenchelys texys* (Synphobranchidae) and *Pachycara thermophilum* (Zoarcidae) from the Broken Spur Hydrothermal Vent Field (Mid-Atlantic Ridge). *Journal of Ichthyology*. 35(9).

RUHL, H. A. & K. L. SMITH Jr 2004. Shifts in Deep-Sea Community Structure Linked to Climate and Food Supply. *Science*. 305: 513-515.

SANCHO, G., C. R. FISHER, S. MILLS, F. MICHELI, G. A. JOHNSON, H. S. NENIHAN, C. H. PETERSON & L. S. MULLINEAUX 2005. Selective predation by the zoarcid fish *Thermarces cerberus* at hydrothermal vents. *Deep Sea Research-I*. 52: 837-844.

SEGONZAC, M. F.M. PORTEIRO & G. CARREIRA 2001. La campagne Americaine DIVERSExpedition. *Lettre Dorsales*. 8(1-2): 16-19.

SEIXAS, S., P. BUSTAMANTE & G. PIERCE 2005. Accumulation of mercury in the tissues of the common octopus *Octopus vulgaris* (L.) in two localities on the Portuguese coast. *Science of the Total Environment*. 340: 113-122.

STEFANNI, S., F. M. PORTEIRO, R. BETTENCOURT, P. J. GAVAIA & R. S. SANTOS 2007. Molecular insights indicate that *Pachycara thermophilum* (Geistdoerfer, 1994) and *P. saldanhai* (Biscoito and Almeida, 2004) (Perciformes: Zoarcidae) from the Mid-Atlantic Ridge are synonymous species. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 45: 423–426.

TURNIPSEED, M., C. D. JENKINS & C. L. VAN DOVER 2004. Community structure in Florida Escarpment seep and Snake Pit (Mid-Atlantic Ridge) vent mussel beds. *Marine Biology* 145: 121-132.

ANEXOS

ANEXO I

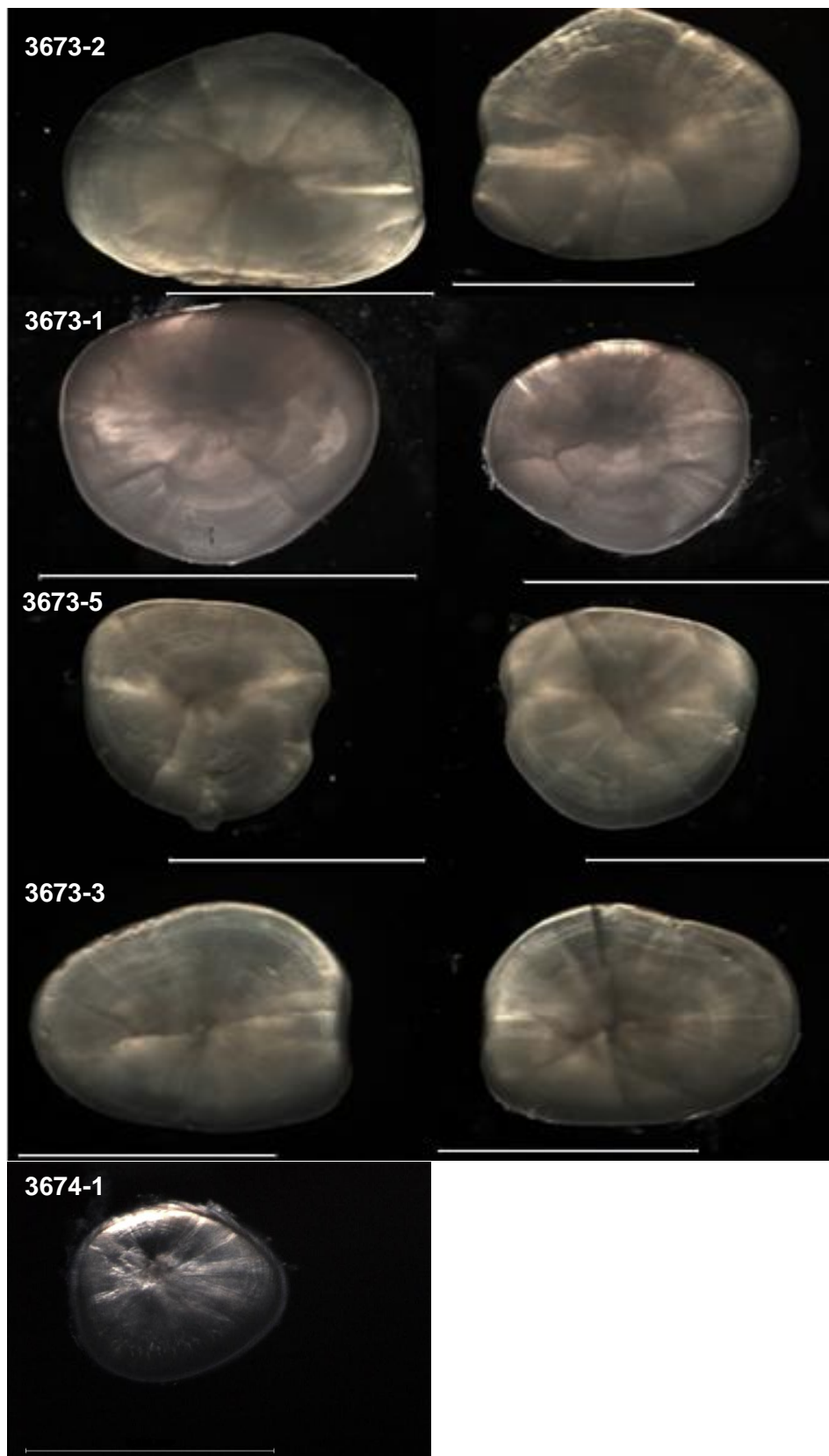


Figura 17 – Fotografias dos otólitos analisados (escala 2mm excepto para o otólito do indivíduo 3674-1: 0,5mm)

ANEXO II

Tabela 6 – Conteúdos estomacais e intestinais de *P. thermophilum* analisados pelo Doutor Michel Segonzac a bordo do NI Atlantis durante a expedição DIVERSExpedition.

Espécime	Conteúdo estomacal	Conteúdo intestinal
3666-1	<ul style="list-style-type: none"> - Carapaça partida de <i>B. puteoserpentis</i> (13 mm) - Peça de parte mole de <i>Phymorhynchus</i> (1 cm) - 3 polychaeta da mesma espécie(1,1 e 2 cm) - 1 camarão (2 cm), antena (2 cm) - 1 gastrópode <i>Shinkailepas briandi</i> (1 mm) 	
3667-1	<ul style="list-style-type: none"> - 1 concha branca (limpet) - 1 peça de <i>Phymorhynchus</i> - 27 <i>Phymorhynchus</i> spp. - 2 partes moles de <i>Phymorhynchus</i> - 1 cápsula com ovos - 3 <i>Phymorhynchus</i> - 1 <i>Phymorhynchus</i> 	- 1 nemátode
3672-1	<ul style="list-style-type: none"> - 1 peça de polychaeta - 2 <i>R. exoculata</i> juvenis - 1 peça de <i>R. exoculata</i> juvenil (?) - 1 peça de <i>Phymorhynchus</i> (?) 	
3672-2	<ul style="list-style-type: none"> - 1 polychaeta - 2 <i>R. exoculata</i> (?) juvenis 	<ul style="list-style-type: none"> - 4 tremátodes - 4 <i>R. exoculata</i> - 1 camarão não identificável - 3 cefalotórax de camarões não identificáveis
3672-3	<ul style="list-style-type: none"> - 2 peças de mexilhões - 2 polychaetas e fezes de polychaeta - 4 <i>R. exoculata</i> juvenis - 3 camarões em más condições, provavelmente <i>R. exoculata</i> juvenis 	
3672-4	<ul style="list-style-type: none"> - 32 <i>R. exoculata</i> juvenis (metade em boa condição) 	- 1 <i>R. exoculata</i> em má condição

ANEXO III

Protocolo do liofilizador

Antes de ligar o sistema verificou-se o nível de álcool absoluto na cuba de refrigeração, onde foi colocado o copo de vidro, bem como o nível de óleo na bomba.

A bomba foi ligada meia hora depois de ter sido ligado o refrigerador, com o sistema de vácuo desligado (com algumas torneiras do vaso de vácuo abertas).

Verificou-se se o copo de vidro estava frio mas sem gelo. Colocou-se o copo de vidro dentro do sistema de refrigeração. Introduziu-se a tampa de esferovite, com cuidado, através dos tubos de vidro do copo.

Encaixaram-se as peças de ligação aos tubos plásticos que estão ligados à bomba e ao vaso de vácuo, pela seguinte ordem: Primeiro colocou-se, dentro da rosca preta, a peça metálica com a zona dentada para fora, depois a peça plástica preta e por último o O-ring. Enroscou-se o tubo de ligação da bomba ao encaixe central do copo de vidro. Enroscou-se o tubo de ligação do vaso de vácuo ao encaixe lateral do copo de vidro. As amostras congeladas foram colocadas (dentro de frascos tapados com “parafilm” perfurado) no vaso de vácuo que foi tapado de seguida com a tampa de vidro.

As torneiras do vaso de vácuo foram fechadas, e a tampa de vidro foi reajustada de modo a que não existissem “fugas” de vácuo.

As amostras foram mantidas a liofilizar durante cerca de 24 horas. Ao fim desse período de tempo desligou-se a bomba e o sistema de refrigeração. Abriram-se as torneiras do vaso de vácuo, e retiraram-se as amostras verificando se estavam completamente liofilizadas. As amostras foram colocadas num excicador para prevenir a entrada de humidade nos frascos.

Deixou-se o sistema de refrigeração atingir a temperatura ambiente e retirou-se o copo de vidro e verteu-se a água resultante da liofilização.



Figura 18 – Liofilizador SAVANT (refrigerador – RVT 400)(bomba – VLP 120).

ANEXO IV

Preparação dos reagentes para análise de mercúrio

Inicialmente preparou-se 1,5 litros de solução de Permanganato de potássio (KMnO_4) a 6%, pesando-se 90g deste reagente numa balança electrónica. Foi utilizado um balão de vidro com fundo plano e um agitador electromagnético, a aproximadamente 60°C , para a dissolução do KMnO_4 .

Foi adoptado o mesmo método para a preparação de Hidroxilamina a 20%, adicionando 300ml de água a 60g deste reagente. A dissolução foi feita agitando o balão de Erlenmeyer.

Prepararam-se 100ml de solução de Cloreto de Estanho (SnCl_2). Pesaram-se 10 gramas de SnCl_2 às quais se adicionaram 20ml de Ácido Clorídrico (HCl) e 80 ml da água tipo II (duplamente destilada). Adicionou-se uma folha de estanho à solução. A solução foi aquecida até atingir o ponto de ebulição numa placa de aquecimento e deixou-se arrefecer à temperatura ambiente.

Determinação da concentração de mercúrio por Espectrofotometria de Absorção Atómica Sem Chama

- 1 – Liofilizaram-se as amostras;
- 2 – Trituraram-se as amostras de músculo e de fígado num almofariz;
- 3 – Pesaram-se cerca de 0,100g de amostra liofilizada em frascos de vidro previamente tarados;
- 4 – A cada frasco adicionou-se 10ml de ácido sulfúrico com um pipetador;
- 5 – Colocaram-se os frascos com as amostras de músculo em banho-maria a 70°C durante uma hora, agitando de 15 em 15 minutos. As amostras de fígado foram mantidas no banho a 70°C durante 6 horas, agitando de 30 em 30 minutos. Após este período, arrefeceram-se as amostras à temperatura ambiente.
- 6 – Adicionou-se 50ml de permanganato de potássio (6%) a cada frasco.
- 7 – As amostras de fígado foram repostas no banho durante mais duas horas.
- 8 – Adicionou-se a cada amostra 15ml de cloreto de hidroxilamina (20%) e agitou-se até a solução ficar incolor.
- 9 - Adicionou-se 50ml de água destilada (Tipo II – bidestilada);
- 10 - Antes de proceder à análise da concentração de Hg, adicionou-se 2,5 ml de cloreto estanhoso a cada frasco
- 11 – O analisador de mercúrio possui um sistema de circulação fechada de ar. O arejador foi introduzido em cada frasco com a solução final do passo anterior (10). O vapor de mercúrio contido no frasco é transportado para a célula de absorção do analisador.



Figura 19 – Sistema analisador de mercúrio (BACHARACH -COLEMAN Model 50 D)



Figura 20 – Amostras em banho-maria a 70°C.

ANEXO V

Processo de histologia das gónadas

1 – retirou-se um segmento de cada gónada. Os fragmentos etiquetados foram colocados em pequenas caixas perfuradas e embebidos em álcool a 70°.

2 – Colocaram-se os fragmentos no processador de tecidos:

- Álcool a 70° - 24 horas;
- Álcool a 95° - 2 horas;
- Álcool a 100° - 1 hora;
- Álcool a 100° - 1 hora;
- Xilol..... - 1 hora;
- Xilol..... - 1 hora;
- Parafina mole (46° - 48°) até ao dia seguinte;
- Parafina dura (56° - 58°) durante 1 hora.

3 – Após o processamento, retiraram-se os tecidos que foram colocados na estufa a 60° até se iniciar a fase seguinte.

4 – Colocaram-se as porções de cada gónada em formas de metal juntamente com a etiqueta. Encheu-se completamente cada forma com parafina nova.

5 – Solidificaram-se os blocos de parafina resultantes, primeiro à temperatura ambiente e depois em cima de uma placa de gelo.

6 – Os blocos foram desenformados e posteriormente congelados até serem cortados.

7 – Efectuaram-se os cortes.

8 – As ténias foram estendidas primeiro em água fria, depois em água quente, antes de serem recolhidas na lâmina.

9 – Colocaram-se as lâminas na estufa a 60°C durante 20 minutos, antes de serem desparafinadas em xilol durante 20 minutos, em caixas-suporte de vidro.

10 – Procedeu-se à coloração dos cortes histológicos:

- Álcool a 100° - 1 min.
- Álcool a 95° - 1 min.
- Álcool a 70° - 1 min.
- Água destilada – 2 vezes – 1 min. Cada
- Hematoxilina de Harris – 5 a 15 min.
- Lavagem em água da torneira (ou Hcl a 1%)
- Água quente da torneira até azular
- Água destilada duas vezes – 1 min. Cada
- Álcool a 70° - 1 min.
- Álcool a 95° - 1 min.
- Eosina (a 1% em álcool a 95%) – 5 min.
- Álcool 95°, rapidamente, duas vezes
- Álcool a 100° duas vezes
- Xilol duas vezes

11 – Finalmente as preparações foram montadas com DPX.



Figura 21 - processador de tecidos (Leica TP1020).



Figura 22 - microtome Leica RM 2035.



Figura 23 – material e reagentes utilizados no processo de coloração das preparações das gónadas.

ANEXO VI

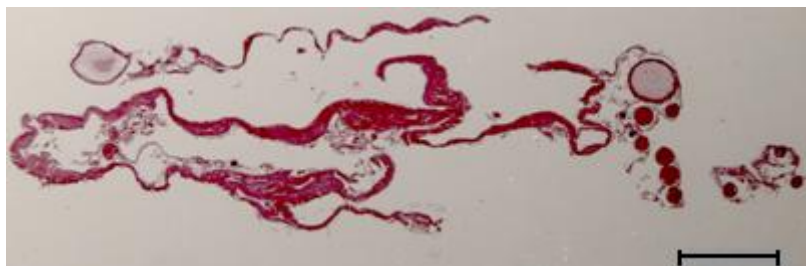


Figura 24 – Gónada feminina do indivíduo 3667-1 (ampliação 10x ; escala:1mm).

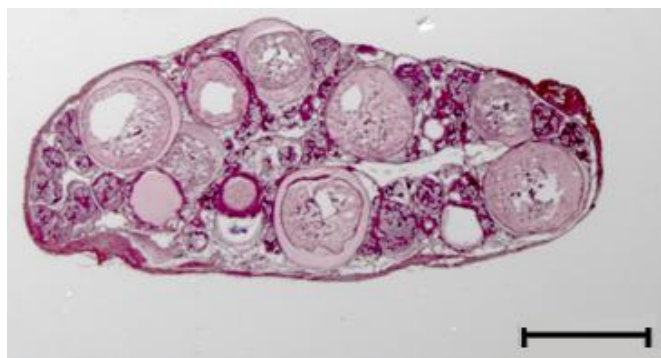


Figura 25 – Gónada feminina do indivíduo 3672-1 (ampliação 10x ; escala: 1mm).

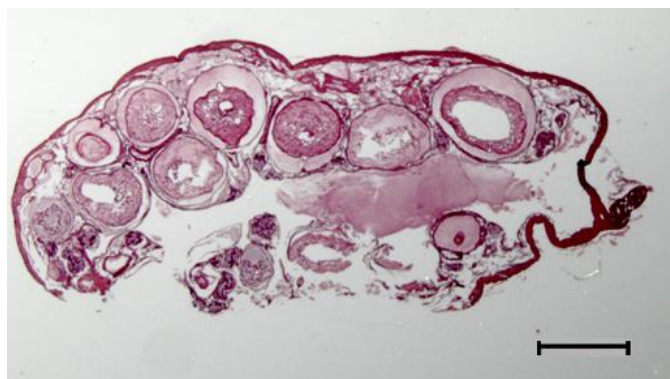


Figura 26 – Gónada feminina do indivíduo 3673-1 (ampliação 10x ; escala: 1mm)

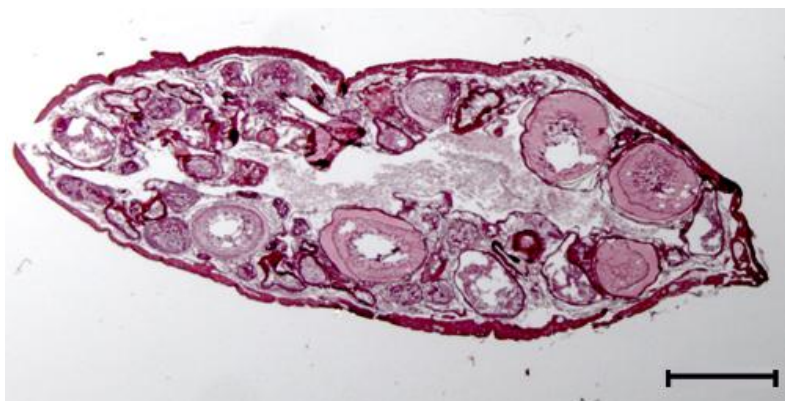


Figura 27 – Gónada feminina do indivíduo 3673-4 (ampliação 10x – escala: 1mm).

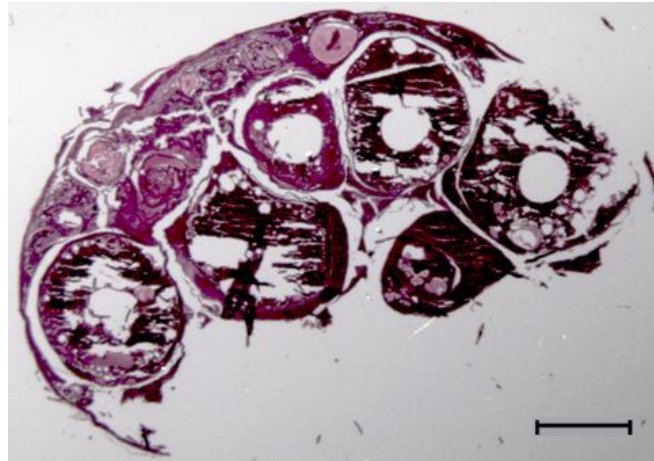


Figura 28 – Gónada feminina do indivíduo 3674-1 (ampliação 10x – escala: 1mm).

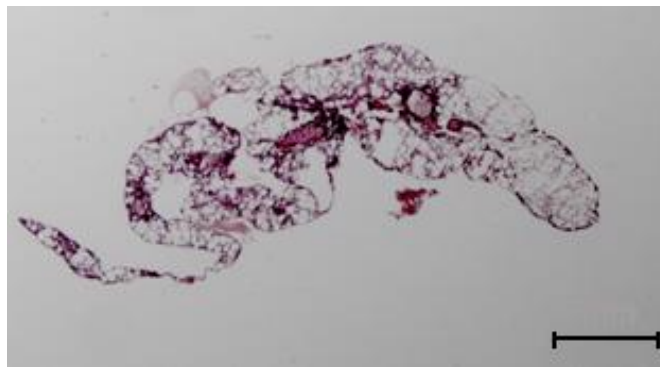


Figura 29 – Gónada masculina do indivíduo 3672-2 (ampliação 10x – escala:1mm).